

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR
MEGHAN GRAHAM**

**EFFETS DE DEUX POLLUANTS ORGANIQUES PERSISTANTS SUR
L'EXPRESSION DU GÈNE DE LA PROLACTINE**

JANVIER 2002

2092

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Dedicated to my mother, Janice.

ACKNOWLEDGEMENTS

I owe important debts to the many who have helped in this endeavor. First, I must give deep thanks to Professor Maria-Grazia Martinoli, who gave me support, guidance, and autonomy to accomplish the work in this thesis. I also give special thanks to Professor Louis Cossette who generously shared his knowledge and experience with me throughout my project.

I am greatly indebted to Joël Rousseau who generously shared his time and laboratory experience in the beginning of this project, instructing me on the disciplines of cell culture and molecular biology. Joël's knowledge, guidance and patience were indispensable.

I am also very thankful to Sylvie Gélinas for her tremendous help throughout my project. She kindly shared her laboratory experience, ideas and valuable advice.

I am grateful to all the members of Professor Martinoli's laboratory that I had the fortunate opportunity to work with. Sonya Grenier was of great help and encouragement as well as valuable insight. In addition, I am thankful to Isabelle Gaumond, Nadine Mayotte, Bruno Lagacé, and Keith Chiasson.

I owe a profound debt of thanks to Sébastien Girard for editing the French portion of the thesis manuscript, improving it greatly with his suggestions and valuable comments.

Finally, on a more personal note, I want to thank family and friends who supported and encouraged me throughout my studies. In particular I would like to thank my father, Mark Graham, and my sister, Treena Chaffey, for their patience and love. My final words of gratitude go out to my mother, Janice Buckley, who instilled in me determination and a thirst for knowledge, both of which brought me to where I am today. Thank you.

"Our fate is connected with the animals"

Rachel Carson, *Silent Spring*, 1962

SOMMAIRE

On suspecte de nombreux pesticides et produits industriels répandus dans l'environnement d'être impliqués dans une variété d'anomalies du système reproducteur et du développement sexuel chez plusieurs populations de vertébrés et d'invertébrés. Il a été suggéré que ces effets étaient liés à la présence de contaminants environnementaux ayant un effet perturbateur sur le système endocrinien. Depuis, de nombreuses études réalisées en laboratoire démontrent que plusieurs de ces contaminants environnementaux ont la capacité de perturber la communication normale entre les hormones et leur cible cellulaire en mimant ou en perturbant l'action des hormones naturelles.

Les contaminants qui ont attiré l'attention des chercheurs sont ceux qui ont un effet similaire à celui de l'œstrogène. Ces composés, connus sous le nom de xénoœstrogènes, ont la capacité de mimer l'action des œstrogènes naturels dans les cellules via une interaction avec les récepteurs de l'œstrogène. Observée dans l'environnement et en laboratoire, cette interférence hormonale par des xénoœstrogènes peut induire chez l'organisme des altérations irréversibles dans sa croissance et son développement.

Cependant, les études *in vitro* ont permis de découvrir d'autres mécanismes par lesquels les contaminants interfèrent avec le système hormonal. Les modes d'actions les mieux démontrés et les plus étudiés sont les suivants : l'activation/l'inhibition des récepteurs œstrogéniques; l'inhibition des récepteurs androgéniques; l'activation des récepteurs de l'aryl-hydrocarbène; et l'altération de la sécrétion, du transport et du métabolisme de certaines hormones telles que les hormones thyroïdiennes.

Pour compliquer davantage les études *in vivo*, les organismes, dans leur milieu naturel, sont constamment exposés aux nombreuses substances présentes dans l'environnement. De plus, certains chercheurs croient que les contaminants, une fois dans la cellule, peuvent interagir ensemble pour induire un effet additif ou même synergique.

Les biphényles polychlorés (BPCs) et le toxaphène sont deux polluants persistants répandus dans l'environnement et ils sont parmi les plus gros polluants trouvés dans les Grands Lacs et l'Arctique. Ils sont parmi les douze polluants persistents organiques représentant le plus grand risque pour la santé humaine ainsi que pour l'environnement (ONU, 1997). De plus, ils font partie des substances perturbatrices du système endocrinien mais les recherches sur leurs mécanismes d'action demeurent contradictoires. En conséquence, ils font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*.

La prolactine (PRL) est une hormone neuroendocrinienne dont la sécrétion est très sensible aux changements hormonaux. La PRL est produite par l'hypophyse antérieure de tous les vertébrés. Sa production et sa libération dans l'organisme sont contrôlées principalement par deux facteurs : les œstrogènes (facteurs d'induction); et la dopamine (facteur d'inhibition) produite par l'hypothalamus. La PRL joue plusieurs rôles chez les vertébrés : de l'induction et du maintien de la production du lait durant la lactation au contrôle du système reproducteur et de l'homéostasie à la régulation du système immunitaire. Chez les poissons, la PRL est nécessaire au phénomène d'osmorégulation, spécialement chez les poissons d'eau douce et les poissons migrateurs.

La sécrétion de PRL dans les lignées cellulaires provenant de l'hypophyse augmente en présence de l'œstrogène (Rhode et Gorski, 1991). Conséquemment, les cellules lactotrophes de l'hypophyse (cellules qui produisent la PRL) sont ainsi une cible potentielle pour mesurer les effets des contaminants ayant des pouvoirs œstrogéniques. Cette caractéristique de la PRL en fait donc une hormone très utile pour élucider les effets des xénoœstrogènes.

Dans la présente recherche, nous avons évalué l'activité œstrogénique possible de deux contaminants environnementaux, indépendamment et combinés, sur l'expression du gène de la prolactine (PRL) dans les cellules tumorales hypophysaires (GH₃) provenant du rat.

Les contaminants utilisés dans cette étude sont le toxaphène et un congénère des BPC, le biphényle tetrachloré 3,3',4,4' (TeCB). Le toxaphène est très lipophile, très persistant et il

est le contaminant le plus retrouvé chez les invertébrés marins et les poissons dans l'Arctique canadien (de Geus et al., 1999). Le TeCB, qui possède un facteur de bio-amplification élevé, est considéré parmi le 17 congénères de BPC les plus abondants dans les tissus humains (Dobson et van Esch, 1993) (Safe, 1994). Cette toxicité est due à la dégradation *in vivo* très lente et à de nombreuses liaisons covalentes à des macromolécules cellulaires (Dobson et van Esch, 1993).

Tous les produits chimiques utilisés ont été préparés et dilués dans l'éthanol (EtOH). Les cellules GH₃ ont été traitées pendant une période de 4 jours avec les composés suivants:

- 1) L'EtOH (véhicule et contrôle, à une concentration finale de 0.1% v/v);
- 2) l'estradiol (E₂) (l'œstrogène naturel le plus abondant);
- 3) le diethylstilbestrol (DES) (un œstrogène synthétique très puissant);
- 4) le TeCB;
- 5) le toxaphène;
- 6) un mélange équimolaire de toxaphène et de TeCB;
- 7) un mélange équimolaire d'E₂ et de TeCB;
- 8) un mélange équimolaire d'E₂ et de toxaphène.

Pour chaque traitement, l'expression du gène de la PRL dans les cellules GH₃ a été mesurée et quantifiée à l'aide de la technique de RT-PCR semi-quantitatif. Cette technique permet d'amplifier quantitativement la présence de l'ARNm de la PRL en la comparant à un standard interne. La visualisation de l'expression de la PRL se fait sur un gel d'électrophorèse et l'analyse quantitative par analyse d'image.

L'expérimentation a permis d'arriver aux résultats suivants :

- 1) **L'E₂, le DES et le toxaphène ont induit une augmentation de l'expression de la PRL.** Le niveau de l'ARNm de la PRL a quadruplé en présence de l'E₂ à une concentration de 10⁻⁹ M (2.3 ppb) comparé au contrôle. Le DES 10⁻⁹ M (2.7 ppb) a également quadruplé le niveau de l'ARNm. Le toxaphène, a une concentration

de 10^{-7} M (40 ppb) a induit une augmentation de deux à trois fois le niveau de l'ARNm de la PRL. À la même concentration que l'E₂ (10^{-9} M), le toxaphène induisait une augmentation de deux fois le niveau de l'ARNm de la PRL comparé au contrôle.

- 2) **Le TeCB n'a eu aucun effet significatif sur l'expression de la PRL.** Dans nos expériences et aux concentrations utilisées, aucun effet du TeCB n'a pu être mis en évidence.
- 3) **Le mélange équimolaire du TeCB et toxaphène a provoqué une diminution de l'expression de la PRL.** Ce résultat pourrait suggérer une interférence du TeCB dans l'induction de l'ARNm de la PRL par le toxaphène.
- 4) **L'E₂ mélangé avec le toxaphène a induit un effet additif de l'expression de la PRL.** Ce résultat démontre qu' il y a un effet additif et non pas un effet synergique entre ces deux substances.
- 5) **L'E₂ mélangé avec le TeCB n'a eu aucun effet sur l'expression de la PRL comparé a l'effet individuel de l'E₂.**

Cette recherche démontre que des deux contaminants environnementaux utilisés, le toxaphène et le TeCB, seulement le toxaphène exercerait un effet œstrogénique *in vitro* tel que mesuré par l'expression du gène de la PRL. En conclusion, le toxaphène aurait donc un pouvoir perturbateur sur le fonctionnement du système endocrinien et sur le système reproducteur, en déclenchant des réponses biologiques normalement induites par les œstrogènes endogènes.

TABLE DES MATIÈRES

ACKNOWLEDGEMENTS.....	iii
SOMMAIRE	v
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
ABRÉVIATIONS	xiii
Chapitre 1. INTRODUCTION	1
1.1 Contexte théorique : Les substances perturbatrices du système endocrinien	1
1.1.1 Manifestation dans l'environnement	3
1.1.2 Manifestations en laboratoire	5
1.1.3 Manifestations chez l'humain.....	6
1.1.4 Complexe "œstrogène-récepteur".....	7
1.1.5 Mode d'action des xénoœstrogènes	9
1.1.6 Les biphenyles polychlorés et le toxaphène.....	12
1.1.7 L'œstrogène et la prolactine	17
1.2 Problématique	19
1.3 Objectifs de ce projet de recherche	19
Chapitre 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION	21
2.1 Préface	21
2.2 Expression of PRL mRNA: <i>In Vitro</i> Modulation by Toxaphene and 3,3',4,4'-TeCB.....	21
ABSTRACT	21
INTRODUCTION	23
MATERIALS AND METHODS	25
Chemicals	25
Cell Culture.....	25
Cytotoxicity	25
Relative quantitative RT-PCR	26
Data analysis.....	27
DISCUSSION	29
REFERENCES.....	32
ACKNOWLEDGEMENTS.....	35
Chapitre 3. CONCLUSIONS.....	40
BIBLIOGRAPHIE	43
ANNEXE 1	49
Liste des substances perturbatrices du système endocrinien	49
ANNEXE 2	51

Synthèse des hormones androgènes et de l'estradiol.....	51
ANNEXE 3	52
<i>The Science of the Total Environment: Guide for Authors</i>	<i>52</i>
ANNEXE 4	56
Lettre d'autorisation du Doyen des études de cycles supérieurs, M. Alain Maire.....	56

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1.	Les cibles biologiques de la prolactine chez les vertébrés.....	18
------------	---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Mécanisme de l'activation d'un gène par l'estradiol ou par une substance œstrogénique dans une cellule.....	8
Figure 2.	Structures chimiques d'une variété de composés œstrogéniques.....	10

ABRÉVIATIONS

ARNm	:	acide ribonucléique messenger
BPC	:	biphenyl polychloré
DDT	:	dichloro-disphényl-trichloroéthane
DHT	:	5 α -dihydrotestostérone
DES	:	diéthylestilbestrol
E ₂	:	estradiol
EtOH	:	éthanol
NRC	:	National Research Council
ONU	:	Organisation des Nations Unis
ppb	:	parts per billion
PRL	:	prolactine
RE	:	récepteur œstrogène
RT-PCR	:	reverse transcriptase-polymerase chain reaction
T	:	testostérone
TBT	:	tributyl-étain
TeCB	:	biphényle tetrachloré 3,3',4,4'
US EPA	:	United States Environmental Protection Agency

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.1 Contexte théorique : Les substances perturbatrices du système endocrinien

Depuis la deuxième guerre mondiale, de vastes quantités de pesticides et de composés industriels se sont retrouvés dans l'environnement, infiltrant tous les écosystèmes du monde. En conséquence, on trouve des traces de ces contaminants dans les tissus gras de la majorité des organismes vivants. Parmi ces contaminants, on identifie des herbicides, des pesticides, des fongicides, des composés plastiques, des polystyrènes, des biphényles polychlorés (BPC), du DDT (voir la liste des abréviations), des dibenzodioxines polychlorinés, des diobenzofuranes polychlorinés (dioxines et furanes) et des alkylphénols (composés des détergents industriels et domestiques) (voir annexe 1) (Colborn et al., 1993).

Il est maintenant bien établi que plusieurs de ces contaminants environnementaux peuvent altérer le système endocrinien de nombreuses espèces vertébrées et invertébrées. Même aux faibles concentrations couramment retrouvées dans l'environnement, il a été suggéré que ces composés peuvent causer des malformations irréversibles du système reproducteur, une diminution du taux de reproduction, des problèmes de développement sexuel, un changement du comportement et même un renversement du sexe chez certaines espèces (Colborn et Clements, 1992).

Ces contaminants, que l'on nomme substances perturbatrices du système endocrinien, ont la capacité d'interférer avec les signaux hormonaux des cellules. Ils exercent leurs effets en mimant ou en bloquant le fonctionnement des hormones naturelles, telles que les œstrogènes, les androgènes (hormones nécessaires aux caractéristiques sexuelles mâles), la progestérone et l'hormone thyroïdienne. Ils sont identifiés comme étant des éléments interférant avec "la synthèse, la sécrétion, le transport, le couplage, l'action ou l'élimination des hormones naturelles dans le corps responsables de la maintenance de l'homéostasie, de la reproduction, du développement, et/ou du comportement" (US EPA, 1997).

Les substances perturbatrices du système endocrinien les plus étudiées sont les substances œstrogéniques, anti-œstrogéniques et anti-androgéniques à cause de l'importance des perturbations reproductrices qu'elles peuvent causer chez les organismes.

Les substances mimant l'action des œstrogènes, appelées les xénoœstrogènes, sont les plus impliquées dans les perturbations du système endocrinien. Les xénoœstrogènes ont la capacité de pénétrer la membrane cellulaire, à l'instar des molécules de l'œstrogène à cause de leur structure lipophile, et d'interagir avec les récepteurs du noyau. Une fois que l'œstrogène ou que le xénoœstrogène s'y est fixé, le récepteur peut engendrer une cascade d'événements qui modifient plusieurs fonctions cellulaires. Plusieurs études ont démontré que les xénoœstrogènes peuvent déclencher des réponses biologiques normalement induites par les œstrogènes. Ces réponses sont liées au développement et à la différenciation sexuelle, à la fertilité et à la régulation des organes reproducteurs chez les femelles. Les effets non désirés des xénoœstrogènes peuvent aussi se poursuivre chez les générations suivantes (voir Kendall et al., 1998 pour une revue de la littérature existante).

La première recherche ayant découvert que le DDT, un pesticide très répandu dans l'environnement, induisait une féminisation morphologique chez le coq, a eu lieu vers 1950 (Burlington et Lindman, 1950). Toutefois, ce n'est qu'au début des années 90 qu'un groupe multidisciplinaire de scientifiques a réussi à faire le lien entre certaines malformations du système reproducteur observées chez plusieurs espèces dans la nature et la présence de contaminants environnementaux dans leur milieu (Colborn et Clements, 1992).

Après avoir répertorié et analysé les études sur les malformations de différentes espèces animales, certains chercheurs ont alors constaté que ces phénomènes anormaux présentaient de nombreuses similitudes (Colborn et Clements, 1992). Ils émettent alors l'hypothèse que ces malformations étaient causées par des contaminants environnementaux tels que le DDT et les BPC en perturbant le système endocrinien.

Depuis, plusieurs chercheurs dans les domaines de l'écologie, de la toxicologie, de la physiologie, de la médecine et de la chimie environnementale s'intéressent à cette problématique (Kendall et al., 1998).

Dans les prochaines sections, les principales investigations sur les manifestations négatives des xénoœstrogènes seront présentées.

1.1.1 Manifestation dans l'environnement

La présence de contaminants environnementaux dans tous les écosystèmes affecte la faune à plusieurs niveaux. Les études ont démontré que les effets secondaires suivant l'exposition aux xénoœstrogènes sont considérables en particulier chez les reptiles, les poissons, les oiseaux, les mammifères marins et chez les invertébrés.

En Floride, dans le Lac Apopka, un déversement de pesticides organochlorés a été identifié comme étant la cause des anomalies morphologiques et de la diminution du taux de reproduction d'une population d'alligators américains (*Alligator mississippiensis*) (Jennings et al., 1988; Woodward et al., 1993). Dans cette population d'alligators, les chercheurs ont trouvé un taux élevé de mortalité *in ovo* (dans l'œuf) ainsi que de graves malformations du système reproducteur chez les nouveau-nés. Ces malformations incluent des testicules anormalement formés, un niveau élevé d'œstrogène, un bas niveau de testostérone et des phallus anormalement petits (Guillette et al., 1994). Les chercheurs ont démontré que l'exposition des embryons des alligators aux pesticides (principalement le DDT et ses métabolites), surtout au stade de la différenciation gonadique, était la cause de ces malformations (Guillette et al., 1995).

Certains escargots de mer sont affectés par le pseudohermaphrodisme (le développement d'organes génitaux mâles par les femelles) et par un déclin important de leur population (Bryan et al., 1986). Ce phénomène serait attribué au tributyl-étain (TBT), un agent anti-salissure trouvé dans les peintures marines et les nettoyeurs utilisés dans certaines usines

(Bryan et al., 1986, Gibbs et al., 1991). Les recherches ont démontré que le TBT interférait avec la synthèse de l'œstrogène causant ainsi une surproduction d'androgène (voir le schéma en annexe 2). Ce surplus d'hormones masculines rendrait les femelles escargots stériles en amenant la formation d'un canal déférent qui, par la suite, bloqueraient leurs oviductes.

Depuis le début des années 90, les scientifiques se préoccupent plus particulièrement du phénomène de la féminisation des poissons de sexe masculin. En Grande-Bretagne, Purdom et collègues (1994) ainsi qu'Harries et son équipe (1995, 1996) ont observé que certains poissons mâles vivant près d'une usine d'épuration des eaux présentaient des concentrations élevées de vitellogénine, une protéine liée à la production du jaune d'œuf. Ce même phénomène a été observé aux États-Unis par Folmar et collègues (1996), Nicolas et collègues ainsi que par Bevans et collègues (références dans Kendall et al., 1998).

Jobling et Sumpter (1993) ont établi *in vitro* que, chez les poissons de sexe masculin, l'induction de la vitellogenèse était liée à un produit de dégradation des détergents et des plastiques présents dans les eaux usées appelé alkylphénol. Normalement, seulement les poissons de sexe féminin peuvent synthétiser la vitellogénine qui est induite par l'estradiol, l'œstrogène naturel le plus abondant (Jobling, 1995).

Une étude récente rapporte un nombre anormalement élevé d'inversion du sexe chez les saumons chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) vivant dans une rivière de l'état de l'Oregon (Nalger et al., 2001). L'analyse génétique de ces saumons a permis de constater que 84% des saumons de sexe féminin échantillonnés avaient en réalité un génotype masculin (XY). Ces résultats signifient que les saumons adultes de sexe féminin étudiés étaient génétiquement destinés à être mâles. La présence de contaminants environnementaux au stade critique du développement gonadique des saumons de sexe masculin est parmi les hypothèses émise par les chercheurs pour expliquer ces observations.

1.1.2 Manifestations en laboratoire

En laboratoire, une étude récente a démontré que, chez le poisson Medaka (*Oryzias latipes*, souche d-rR), une seule exposition au DDT, au stade embryonnaire, causait une inversion de sexe complète et permanente, de mâle à femelle, chez 86% des cas étudiés (Edmunds et al., 2000). Pour reproduire le transfert mère-œuf des contaminants lipophiles à l'embryon, les scientifiques ont injecté le DDT directement dans le jaune d'œuf. Une fois que ces "femelles" XY ont atteint la maturité, l'accouplement avec des mâles normaux (XY) ont alors produit des larves viables. Les chercheurs ont conclu qu'un pesticide œstrogénique, le DDT, présent à une période critique du développement gonadique, pouvait altérer profondément la différenciation sexuelle.

Bergeron et collègues (1994) ont constaté *in vitro* que des doses élevées de BPC administrées dans des œufs de tortue pouvaient affecter la différenciation sexuelle des embryons normalement influencée par la température. En effet, les œufs de la tortue à ouïe rouge (*Trachemys scripta*) injectés aux BPC et incubés à une température nécessaire pour produire des mâles, produisent un excès de femelles. Ces résultats indiquent que certains BPC ont la capacité d'interrompre les mécanismes de détermination sexuelle et le pouvoir d'agir comme œstrogène en influençant la différenciation gonadique. Une autre étude sur la même espèce de tortue a démontré qu'il n'y avait pas seulement une augmentation du nombre de femelles suivant une exposition aux BPC, mais que les tortues mâles, ayant été exposés avaient aussi des niveaux diminués de testostérone et qu'elles étaient démasculinisées (Willingham et al., 2000).

Soto et collègues (1991) ont été la première équipe de chercheurs à démontrer l'effet œstrogénique du nonylphénol, un produit de dégradation des plastiques et des nettoyants domestiques. Dans leur étude, ils ont découvert que le nonylphénol avait le même effet que l'œstrogène, soit la prolifération cellulaire, sur les cellules MCF-7. Cette lignée cellulaire tumorale provient du cancer du sein chez l'humain et elle est considérée comme hormono-dépendante car elle a besoin de la présence de l'œstrogène pour se

multiplier. Depuis, de nombreuses études ont confirmé les propriétés œstrogéniques du nonylphénol sur de nombreux systèmes cellulaires (voir National Research Council, 1999 pour une revue de la littérature).

1.1.3 Manifestations chez l'humain

L'effet des xénoœstrogènes chez l'humain est un sujet très controversé. Les liens entre l'exposition aux substances perturbatrices et l'augmentation des maladies telles le cancer du sein, de la prostate, le déclin des spermatozoïdes chez l'homme et l'apparition de troubles psychologiques chez les enfants sont très difficiles à établir. Les arguments sont souvent fondés sur le fait que ces tendances coïncident sommairement avec l'utilisation et la libération croissante de ces produits chimiques dans l'environnement de même que sur les mécanismes d'actions plausibles.

Cependant, une recherche récente a identifié des malformations du système reproducteur suivant l'exposition aux substances perturbatrices chez une population spécifique. À Taiwan, Guo et collègues (2000) ont étudié les spermatozoïdes des enfants des victimes d'une intoxication causée par l'ingestion d'huile de cuisson contaminée aux BPC. Les chercheurs ont constaté que les spermatozoïdes des garçons exposés *in-utero* à l'huile contaminée au BPC étaient morphologiquement anormaux et avaient une motilité réduite.

Une étude réalisée en 1998 par une équipe américano-danoise a découvert un lien entre l'exposition au dieldrine, un pesticide, et le risque d'avoir le cancer du sein chez les femmes (Høyer et al., 1998). L'équipe a déterminé que la concentration du dieldrine dans le sang était associée avec une augmentation significative du cancer du sein. Le dieldrine était déjà connu pour ses effets œstrogéniques dans une lignée cellulaire du cancer du sein, les MCF-7 (Soto et al., 1994, 1995; Sonnenschein et al., 1995).

Cependant, les études sur les effets néfastes des substances perturbatrices chez les humains sont peu nombreuses et contradictoires. Les chercheurs utilisent donc les résultats des études sur les effets des xénoœstrogènes dans l'environnement et en laboratoire comme substrat pour mieux connaître leur pouvoir déséquilibrant sur les organismes.

Ainsi, la communauté scientifique est généralement d'accord pour affirmer que plusieurs xénoœstrogènes pourraient gravement perturber le développement endocrinien et sexuel des animaux.

Par contre, les mécanismes cellulaires à la base des effets perturbateurs des xénoœstrogènes ne sont pas bien connus. Il serait essentiel de comprendre leurs mécanismes afin d'arriver à contrôler leurs effets perturbateurs. Les essais *in vitro* sont aujourd'hui un outil indispensable pour étudier leur fonctionnement. Ils permettent aux chercheurs d'identifier les modes d'actions de ces molécules au niveau cellulaire en comparant l'action des œstrogènes naturelles avec celles des xénoœstrogènes.

1.1.4 Complexe "œstrogène-récepteur"

L'œstrogène, hormone du système endocrinien, est essentiel à la reproduction et à la différenciation sexuelle. Le type d'œstrogène le plus abondant dans l'organisme de tous les vertébrés est l'estradiol, une molécule hydrophobe qui pénètre facilement les membranes cellulaires et nucléaires pour se retrouver dans le noyau (Figure 1). L'action de l'estradiol s'effectue principalement par une association avec des récepteurs intracellulaires (ER). L'activation des récepteurs, par la capture de l'estradiol, est suivie par la fixation du complexe œstrogène-récepteur sur des séquences cibles de l'ADN appelée "éléments de réponse aux œstrogènes". L'interaction entre le complexe œstrogène-récepteur et l'ADN entraîne une réponse biologique, soit la l'augmentation ou

la répression de la transcription¹ d'un gène en ARN messager et ensuite la traduction du message en protéine.

Parmi les gènes induits par l'activation du complexe "œstrogène-récepteur" il y a :

- 1) la prolactine chez tous les vertébrés;
- 2) la vitellogénine chez les poissons et les amphibiens;
- 3) la progestérone;
- 4) la créatine kinase;
- 5) le récepteur du facteur de croissance épiderme (EGF);
- 6) le facteur de croissance « *insulinlike* » (IGF);
- 7) et nombreux autres gènes.

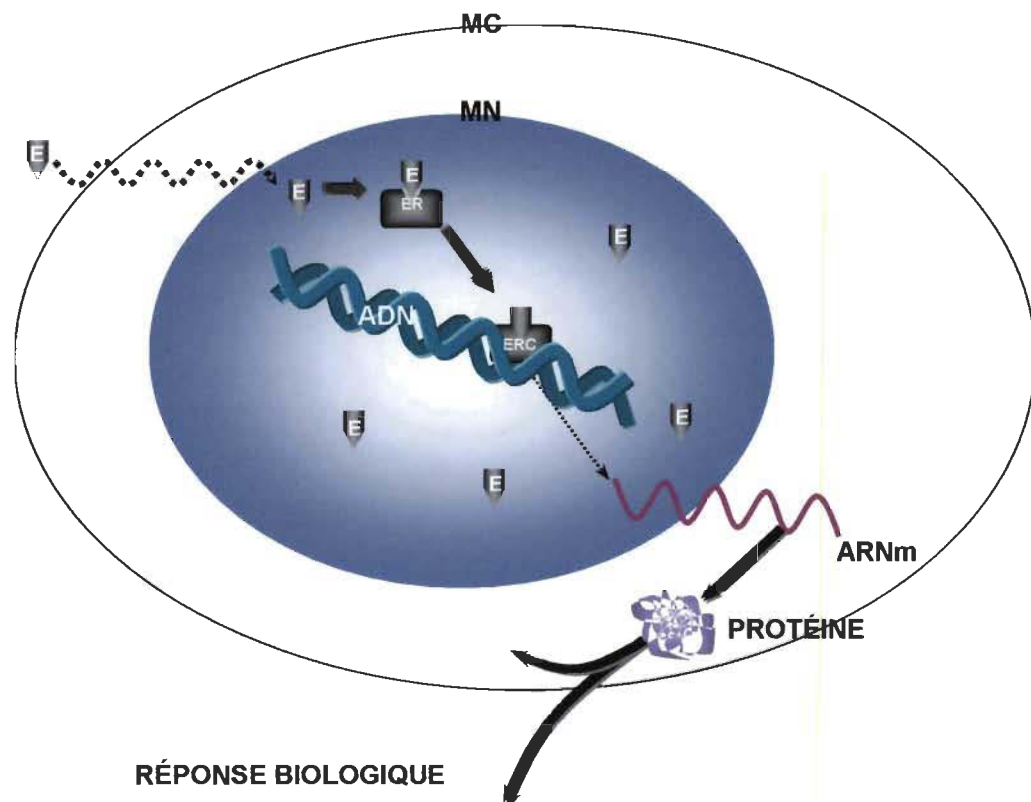


Figure 1. Mécanisme de l'activation d'un gène par l'œstrogène dans une cellule. MC=membrane cellulaire, MN=membrane nucléaire, E=œstrogène, ER=récepteur œstrogénique intracellulaire, ERC= complexe œstrogène-récepteur.

¹ Processus par lequel la séquence d'un gène est copiée en ARN messager

1.1.5 Mode d'action des xénoœstrogènes

Le terme xénoœstrogène désigne plusieurs composés très variés structurellement. Mais, à l'instar de la molécule de l'estradiol, on retrouve dans la structure des xénoœstrogènes la présence d'un ou plusieurs anneaux phénoliques (Figure 2). Cette propriété structurelle semble être nécessaire à leurs activités œstrogéniques (Korach et al., 1997). Par contre, la présence d'un anneau phénolique n'est pas suffisante pour prédire les pouvoirs œstrogéniques d'un composé.

Les xénoœstrogènes peuvent affecter profondément le développement et la reproduction des organismes par l'interaction et l'activation des récepteurs d'œstrogènes. Ainsi, les xénoœstrogènes agissent comme messagers chimiques en pénétrant dans les mécanismes de signalisation normalement réservés aux œstrogènes.

L'identification des xénoœstrogènes doit donc être effectuée par plusieurs tests *in vivo* et *in vitro* basés sur deux facteurs principaux qui déterminent le pouvoir œstrogénique d'un composé :

- 1) l'affinité pour le récepteur œstrogène;
- 2) leur capacité à induire les réponses biologiques normalement liées à l'œstrogène (par exemple la transcription d'un gène).

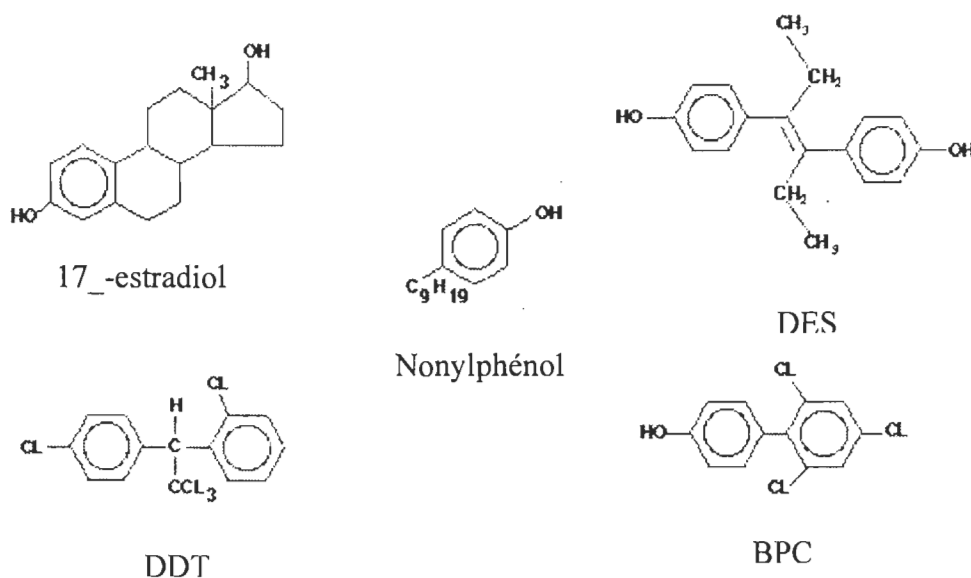


Figure 2. Structures chimiques d'une variété de composés œstrogéniques.

Les expérimentations en laboratoire permettent de mesurer ces deux facteurs. Mais, pour identifier et mieux comprendre les modes d'action des xénoœstrogènes, un autre type d'expérimentation est nécessaire : les expérimentations mécanistes *in vitro*, en utilisant des cellules en culture. Ce sont ces expérimentations qui ont permis d'identifier les trois principaux modes d'action par lesquels les substances perturbatrices interagissent avec les récepteurs cellulaires du système endocrinien.

1. **Imitation de l'action de l'œstrogène**: les xénoœstrogènes se couplent et activent les récepteurs d'œstrogènes intracellulaires et déclenchent la même réponse biologique. Une fois couplé au récepteur, le complexe hormone-récepteur se liera à l'ADN et la transcription ou régulation d'un gène suivra. Lors de la transcription du gène, elle sera par la suite transcrite en ARNm (acide ribonucléique messager), le précurseur d'une protéine (Figure 1).
2. **Inactivation du récepteur d'œstrogène** : les xénoœstrogènes peuvent empêcher la réponse biologique en inactivant le récepteur en se couplant à lui. Ils empêchent ainsi l'action des œstrogènes en diminuant le nombre de récepteurs disponibles et

en déplaçant l'œstrogène de son récepteur. Les xénoœstrogènes ayant ce mode d'action se nomment anti-œstrogènes.

3. **Inactivation du récepteur d'androgène:** une molécule, comme le DDT, peut inhiber l'interaction du récepteur d'androgène avec ses ligands endogènes, la testostérone (T) et la 5 α -dihydrotestostérone (DHT). Le T et le DHT sont des déterminants fondamentaux du phénotype mâle et l'interférence avec leurs actions peuvent résulter dans une démasculinisation du tracte reproducteur, comme observé chez les rongeurs mâles traités *in utero* (Gray et al., 1994).

Pour mesurer l'activité œstrogénique des xénoœstrogènes et leurs mécanismes d'action *in vitro*, trois méthodes de recherche sont couramment utilisées.

1. **Mesure de la prolifération cellulaire.** Certaines lignées de cellules tumorales ont besoin d'œstrogènes pour proliférer. Par conséquent, une prolifération cellulaire importante indique la présence d'un composé œstrogénique. La lignée cellulaire MCF-7 provenant de cellules tumorales du cancer du sein chez l'humain est la plus utilisée pour ce genre de recherche.
2. **Mesure de couplage aux récepteurs œstrogéniques.** Le couplage d'un composé tel l'E₂ au récepteur de l'œstrogène (ER) est la première étape dans le déclenchement d'une réponse biologique comme la différenciation sexuelle chez l'embryon. La mesure de l'affinité s'effectue au moyen de l'E₂ doté d'un marqueur radioactif (³H). L'³H-E₂ est incubé avec des ER pour que tous les sites de liaisons sur les ER soient saturés. Subséquemment, on incube les xénoœstrogènes qu'on veut tester. Après un certain temps, on mesure le pourcentage d'³H-E₂ libre qui a été déplacé des sites de couplage par les xénoœstrogènes.
3. **Mesure de l'expression d'un gène.** Le potentiel œstrogénique d'un composé peut aussi être déterminé *in vitro* par la mesure de l'ensemble des mécanismes

moléculaires et géniques conduisant au déclenchement de l'expression d'un gène spécifique. Ce processus est aussi appelé "l'induction d'un gène". Par conséquent, la mesure de l'expression de gènes tels la vitellogénine ou la prolactine, normalement induite par l'œstrogène, peut servir à indiquer le potentiel œstrogénique de certaines substances.

1.1.6 Les biphényles polychlorés et le toxaphène

Les BPC et le toxaphène sont parmi les douze polluants organiques persistants les plus toxiques identifiés par l'Organisation des Nations Unies (ONU). L'ONU considère qu'ils représentent une menace pour l'environnement et la santé humaine surtout dans les régions arctiques (ONU, 1997). Ils s'accumulent dans les tissus gras, se concentrent au sommet de la chaîne alimentaire, persistent dans l'environnement pour de longues périodes et peuvent traverser de longues distances afin d'atteindre des régions éloignées. Par conséquent, les BPC et le toxaphène sont les contaminants les plus présents dans les milieux aquatiques au Canada et dans la faune arctique (Lockhart et al., 1992). Leur omniprésence dans l'environnement couplée à leurs propriétés perturbatrices controversées font l'objet d'une préoccupation environnementale mondiale.

1.1.6.1 Les biphényles polychlorés

Les BPC sont des produits chimiques organochlorés très utilisés comme isolant électrique, comme agent plastifiant, comme stabilisateur dans la fabrication des lubrifiants, dans les colles, les peintures, les résines synthétiques ainsi que comme insecticide. Ils sont considérés comme très dangereux pour l'environnement en raison de leur persistance dans la nature, leur toxicité et de leur capacité de s'accumuler dans la chaîne alimentaire (Environnement Canada, 1986).

Plus de 200 congénères des BPC existent présentement. Le terme congénère est utilisé ici pour désigner les produits appartenant au même groupe chimique, mais qui se diffèrent

dans leur nombre et position d'atomes de chlores. Les congénères des BPC ont été synthétisés pour servir de fluide isolant pour les transformateurs électriques et pour d'autres applications industrielles. Les propriétés thermostabilisatrices des BPC sont responsables de leur persistance dans l'environnement. Ainsi, malgré leur interdiction dans les années 70 au Canada et aux États-Unis, les BPC sont une des molécules les plus présentes et persistantes dans la nature. Par conséquent, ils sont encore présents dans les sols et les sédiments de la région des Grand Lacs et des régions de l'Arctique où ils n'ont jamais été utilisés.

Une fois dans l'environnement, les BPC s'accumulent dans les tissus gras des animaux qui les consomment et sont bio amplifiés. La bio amplification est un phénomène de rétention d'une substance dans les tissus à des teneurs de plus en plus élevées au fur et à mesure que l'on s'élève dans la hiérarchie des organismes de la chaîne alimentaire (Environnement Canada, 1986). En conséquence, des niveaux élevés de BPC existent chez une population d'orques (*Orcinus orca*) de Colombie-Britannique (Ross et al., 2000), les ours polaires (Skaare et al., 2000, Muir et al., 1999) et les bélugas du fleuve St-Laurent (Béland et al., 1993).

Les BPC se retrouvent aussi dans l'organisme humain. Dans une recherche effectuée dans le nord du Québec, les niveaux de BPC d'une population de 30 Inuits ont été évalués jusqu'à 70 fois plus élevés que chez une population du sud du Québec (Courtney et al., 2000). Ces niveaux élevés peuvent être expliqués par l'alimentation des Inuits qui est basée sur des animaux (poissons et mammifères marins) fortement contaminés par les BPC. Malheureusement, les concentrations des BPC dans l'Arctique diminuent très peu (Macdonal et al., 2000).

De nombreuses études ont été effectuées sur les propriétés perturbatrices des BPC, mais les résultats demeurent contradictoires.

Korach et collègues (1988) ont trouvé que plusieurs congénères de BPC peuvent se lier au récepteur de l'œstrogène. De plus, Jansen et collègues (1993) et Soto et collègues

(1995) on démontré que plusieurs congénères de BPC induisent la prolifération des cellules MCF-7. Malgré ces évidences, plusieurs autres chercheurs croient que ce sont les métabolites, les sous-produits de la transformation biologique et chimique du BPC dans l'organisme (par le foie par exemple), qui ont le plus grand pouvoir œstrogénique (Jansen et al., 1993; Safe, 1994; Ramamoorthy et al., 1999). Par exemple, Fielden et collègues (1997) ont découvert que le BPC 104 se liait au récepteur œstrogénique (ER), augmentait la prolifération cellulaire dans les MCF-7 et induisait l'expression du gène du ER, mais son métabolite, le 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), était plus œstrogénique encore, indiquant que les métabolites et leurs parents peuvent agir comme des œstrogènes *in vitro*.

1.1.6.2 Le biphényle tetrachloré 3,3',4,4'

Le biphényle tetrachloré 3,3',4,4' (TeCB) est un congénère des BPC très toxique ayant un potentiel de bio accumulation important (Dobson et van Esch, 1993). Il se dégrade lentement dans l'environnement et dans les organismes vivants en raison des nombreuses molécules de chlore qui le composent. En conséquence, le TeCB est parmi les congénères des BPC le plus abondant dans les tissus adipeux humains (NRC, 1999). Il provient de certains mélanges de BPC commerciaux tels que l' *Aroclor 1242, 1248, 1254, et 1260* (marques de commerce).

Les recherches sur les effets du TeCB sont contradictoires. Selon les études, le TeCB aurait soit un effet anti-œstrogénique, soit œstrogénique.

Ainsi, au début des années 90, deux études ont démontré que le TeCB avait des propriétés anti-œstrogéniques sur les cellules MCF-7 (Krishnan et Safe, 1993) et sur les cellules de l'hypophyse antérieure (Jansen et al., 1993). Quelques années plus tard, des chercheurs ont plutôt affirmé que le congénère TeCB était œstrogénique tel que démontré par la mesure *in vitro* de l'expression d'un gène et par l'activation des récepteurs œstrogéniques (Nesaretnam et al., 1996). Enfin, au tournant des années 90, une équipe de recherche est arrivée aux mêmes conclusions que la recherche de Krishnan et Safe

(1993), a savoir que le TeCB avait un effet anti-œstrogénique sur la lignée de cellules MCF-7 (Ramamoorthy et al., 1999). Selon leurs recherches, le TeCB inhiberait la prolifération des cellules MCF-7 en se fixant aux récepteurs androgéniques (Ramamoorthy et al., 1999; Safe, 1994).

1.1.6.3 Toxaphène

Le toxaphène est un contaminant très lipophile et très volatile qui était fortement utilisé comme insecticide et piscicide (agent causant la mort chez les poissons) en Amérique du Nord jusqu'à son interdiction dans les années 80. L'usage du toxaphène a cessé après la découverte qu'il persistait dans l'environnement aquatique ce qui empêchait la réussite de l'ensemencement des lacs avec des poisson désirables (Lee et al., 1977). Ce contaminant est présentement le polluant organique persistant le plus abondant dans l'Arctique canadien (Braune et al., 1999) et les Grands Lacs (Stelzer et Chan, 1999). Il a été répandu dans ces régions principalement par le transport et la déposition atmosphérique (Barrie et al., 1992).

Les niveaux de toxaphène sont très élevés dans le Lac Supérieur et les poissons au sommet de la chaîne alimentaire sont les plus contaminés (Kucklick et Baker, 1998; Swackhamer et al., 1998; Whittle et al., 2000). La consommation de poissons contaminés au toxaphène, est la principale source d'exposition chez les humaines, en particulier chez les Inuits du Grand Nord (voir De Geus et al., 1999).

Dans les milieux arctiques, le toxaphène est présent dans les graisses de nombreux animaux. Le phénomène de bio-amplification est un facteur important dans ces milieux car la survie de ces animaux dépend de leur capacité à accumuler les graisses. Par conséquent, les niveaux de toxaphène chez les poissons et les mammifères marins, tel le phoque et la baleine, sont très importants dans l'arctique malgré la distance des sources de contamination (voir De Geus et al., 1999).

À des concentrations élevées le toxaphène est hautement toxique pour les organismes aquatiques. Chez les mammifères il est neurotoxique, génotoxique, ainsi que carcinogène et mutagène. Malgré ces études les risques potentiels aux humains sont peu connus (voir de Geus et al., 1999).

Les recherches mesurant les effets perturbateurs du toxaphène *in vitro* sont contradictoires comme celles sur les effets du TeCB. Selon ces études, le toxaphène pourrait être soit œstrogénique, non-œstrogénique ou anti-œstrogénique.

Vers le milieu des années 90, certains chercheurs ont affirmé que le toxaphène pouvait induire la prolifération cellulaire dans les cellules MCF-7 (Soto et al., 1994, 1995; Sonnenschein et al., 1995; Stelzer et Chan, 1999).

Cependant, selon Vonier et collègues (1996), qui ont étudié l'effet du toxaphène chez l'alligator américain, le toxaphène ne se couplerait pas aux récepteurs œstrogéniques de ces prédateurs. Il serait donc non-œstrogénique chez les alligators. Par contre, combiné à d'autres pesticides, le toxaphène déplace l'estradiol de son récepteur. Dans ce cas, il aurait un effet œstrogénique combiné.

Un an plus tard, Ramamoorthy et collègues (1997) ont publié également que le toxaphène ne se couple pas aux récepteurs d'œstrogènes. Leurs recherches ont démontré que le toxaphène induisait peu la prolifération cellulaire et l'expression d'une protéine sensible à l'œstrogène à des concentrations de 2.5×10^{-5} M et 1×10^{-5} M, respectivement. Ils ont donc conclu que le potentiel œstrogénique du toxaphène était minime.

Durant la même période, Ratnasabapathy et collègues (1997) ont trouvé que le toxaphène empêchait l'expression d'un gène provenant du foie de coq (effet anti-œstrogénique). Bonefeld et Jorgensen (1997) ont affirmé, quant à eux, que ce contaminant bloquait l'action de l'œstrogène dans les récepteurs d'œstrogènes (effet anti-œstrogénique).

Quelques années plus tard, de nouvelles études ont souligné l'effet non-œstrogénique du toxaphène. Ainsi, une équipe de recherche (Smeets et al., 1999) a trouvé que le toxaphène n'induisait pas l'expression du gène du vitellogène. De plus, Hodges et collègues (2000) ont découvert que le toxaphène n'induisait pas la prolifération cellulaire dans les cellules provenant de l'utérus de rat.

Enfin, autour de la même période, Arcaro et collègues (2000) ont publié que le toxaphène n'était pas œstrogénique mais qu'il serait plutôt anti-œstrogénique parce qu'il réduisait la prolifération cellulaire des cellules MCF-7 et qu'il ne se liait pas aux récepteurs œstrogéniques.

1.1.7 Les œstrogènes et la prolactine

Les oestrogènes sont constituées par l'oestradiol et par l'oestrone, qui sont inter convertibles, l'oestradiol étant plus puissant que l'oestrone. Chez les mammifères, leur biosynthèse nécessite l'implication de plusieurs types cellulaires, dont les cellules de la granulose et de la thèque de l'ovaire. Dans le follicule primitif, l'oestradiol est produit par les cellules de la granulose sous l'effet de la FSH hypophysaire qui en augmente l'activité aromatase. Dans le sang les oestrogènes sont liées à la « sex steroid binding globulin » (SSBG). Au niveau cellulaire, l'oestradiol se lie à un récepteur cytoplasmique de 595 acides aminés et son mode d'action a été déjà décrit à la section 1.1.4.

La prolactine (PRL) est une hormone généralement connue pour sa capacité d'induire la lactation chez les mammifères. Cependant, son champ d'action est plus large. En fait, cette hormone présente dans tous les vertébrés étudiés à ce jour serait impliquée dans plus de 300 fonctions biologiques (Bole-Feysot et al., 1998). Selon Bole-Feysot et collègues (1998) celles-ci peuvent être résumées en six catégories :

- 1) osmorégulation;
- 2) croissance et développement;

- 3) métabolisme;
- 4) fonctionnement du cerveau et comportement;
- 5) reproduction;
- 6) immunoprotection.

La PRL est synthétisée spécifiquement au niveau de l'hypophyse chez les mammifères et des branchies chez les poissons. Les cibles biologiques de la prolactine chez les vertébrés sont résumées au Tableau 1. Chez tous les vertébrés, l'E₂ est la principale hormone impliquée dans le contrôle de la synthèse de la PRL. En effet, la présence de l'E₂ induit la transcription du gène de la PRL.

Chez les poissons, la PRL est importante pour l'osmorégulation. Certains chercheurs croient que les problèmes d'osmorégulation sont l'une des causes de la diminution dramatique de la population du saumon de l'Atlantique (Fairchild et al., 1999). La surproduction de la PRL pourrait causer une dérégulation dans l'équilibre ionique, ce qui amènerait un problème d'adaptation majeur chez les poissons qui migrent de l'eau douce vers l'eau salée.

TABLEAU 1. Les cibles biologiques de la prolactine chez les vertébrés.

Tissus ou cellules		
Foie	Branchies (poissons et amphibiens)	Tissu lymphoïde
Poumons	Vessie (poissons, reptiles, amphibiens)	Tracte gastro-intestinal
Cœur	Pancréas	Tissu adipeux brun
Adipocytes (oiseaux)	Rein	Muscles squelettiques
Système nerveux central (Cerveau, ganglions, hypophyse, cortex surrénalien).	Système reproducteur femelle (Ovaire, oviducte, glandes mammaires, utérus, placenta).	Système reproducteur mâle (Testicules, épидидymes, vésicule séminal, prostate).

Steinmetz et collègues (1997) ainsi que Chun et Gorski (2000) ont démontré que la PRL pouvait être induite *in vitro* par le bisphénol A, un xénoœstrogène retrouvé dans les

obturations dentaires, les boîtes de conserves et matériaux plastiques. L'octylphénol, un autre xénoœstrogène retrouvé dans les surfactants et nettoyeurs domestiques, induit également l'expression de la PRL *in vitro* (Abraham et Frawley, 1997). Les auteurs de cette dernière recherche ajoutent que des investigations additionnelles devraient être réalisées pour mieux comprendre les effets des contaminants œstrogéniques sur les gènes sensibles à l'œstrogène, comme le gène de la PRL.

1.2 Problématique

L'expression du gène de la prolactine (PRL) est induite par les œstrogènes. Par conséquent, cette hormone est une cible potentielle pour plusieurs contaminants œstrogéniques. Peu d'études *in vitro* se sont attardés à la problématique de l'induction du gène de la prolactine par le toxaphène et le TeCB. Pourtant, la PRL est une hormone importante pour la reproduction et le développement des vertébrés ainsi que pour l'osmorégulation chez les poissons.

Comme déjà expliqué dans les sections précédentes, les propriétés perturbatrices du système endocrinien par le toxaphène et le TeCB demeurent ambiguës. De nouvelles recherches utilisant différents procédés sont maintenant nécessaires pour clarifier ces propriétés. Conséquemment, dans cette recherche, la mesure de l'induction de la PRL est le moyen choisi pour évaluer le potentiel œstrogénique du toxaphène et du TeCB.

1.3 Objectifs de ce projet de recherche

Plusieurs techniques existent pour mesurer l'action œstrogéniques des xénoœstrogènes comme décrit dans les pages précédentes. L'une de ces méthodes implique la mesure de l'induction d'un gène qui réagit normalement à l'œstrogène par la technique de *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* -semi-quantitatif (RT-PCR). Cette technique implique la quantification relative des niveaux d'ARNm produits suite à l'induction du gène par l'œstrogène.

L'objectif général de cette recherche est d'évaluer l'influence de deux contaminants environnementaux importants, le toxaphène et le TeBC, sur l'expression de la PRL dans les cellules en culture. Les cellules provenant de l'hypophyse de rat, les GH3, ont été choisies notamment parce l'œstrogène induit la transcription de la PRL (Rhode et Gorski, 1991). Ces cellules sont une cible potentielle aux effets des contaminants ayant des pouvoirs œstrogéniques. Cette caractéristique des cellules GH3 en fait donc une lignée cellulaire très utile pour mesurer les effets des xénoœstrogènes.

Selon certaines études, le toxaphène et le TeCB sont identifiés comme deux modulateurs endocriniens ayant le pouvoir d'imiter l'action des œstrogènes en induisant la transcription d'un gène. De plus, nombreux chercheurs spéculent que ces contaminants peuvent interagir ensemble pour induire un effet synergique (Soto et al., 1995; Sumpter et Jobling, 1995; Bergeron et al., 1994) ou même augmenter les effets de l'E₂ (Rajapakse et al., 2001). Ceci nous amène à vouloir répondre à la question de recherche suivante : le toxaphène et le TeCB vont-ils influencer l'expression du gène de la PRL dans les cellules GH₃?

Les objectifs spécifiques de ce projet de recherche sont les suivants :

1. Comparer l'effet de l'E₂, le toxaphène et le biphényle tetrachloré 3,3',4,4' (TeCB) sur la modulation de l'expression du gène de la PRL dans les cellules GH₃;
2. Examiner si le toxaphène et le TeCB combinés, ainsi que chaque composé mélangé à l'E₂, induisent des effets combinés ou synergiques sur l'expression de la PRL.

Chapitre 2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1 Préface

Le chapitre 2 est écrit en langue anglaise et rédigé sous la forme d'un article scientifique. Ce dernier sera soumis au journal « *The Science of the Total Environment* ». Le style présenté dans cette section est conforme à celui de ce journal (voir annexe 3).

2.2 Expression of PRL mRNA: *In Vitro* Modulation by Toxaphene and 3,3',4,4'-TeCB.

M. Graham, L. Cossette, J. Rousseau and M-G. Martinoli

Department of Chemistry and Biology, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Canada.

ABSTRACT

It is now well recognized that many environmental contaminants are capable of disrupting endocrine processes in a variety of species, including birds, mammals, reptiles, and fish. Among these contaminants are toxaphene and PCBs, two of the most prevalent contaminants present in aquatic food chains of the Great Lakes and the Canadian Arctic region. Current research has demonstrated that toxaphene and PCBs are also endocrine-disruptors yet notable contradictions exist in research on their estrogenic potential *in vitro*. We set out to investigate the possible endocrine modulating activity of toxaphene, the PCB congener 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TeCB), an equimolar mixture of both compounds (toxaphene/TeCB), as well as estradiol (E_2) (E_2 /toxaphene, E_2 /TeCB) on prolactin (PRL) mRNA expression. PRL is an estrogen-inducible gene and pituitary-derived GH₃ cells were used because they express PRL and as such allow the quantification of the estrogenic potency of toxaphene and TeCB. Using relative quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), we determined that PRL mRNA levels in the presence of E_2 at concentrations of 10^{-7} and 10^{-9} M were 3 to 5-fold higher than that of the control. Concentrations ranging from 10^{-7} to 10^{-11} M for

both toxaphene and TeCB were assayed but only toxaphene modulated PRL mRNA levels. Maximal induction by toxaphene was seen at 10^{-7} M, resulting in a more than two-fold increase in PRL mRNA levels. No synergistic interactions were observed for combinations of test substances, while an additive response was observed for the equimolar mixture of E_2 /toxaphene at a concentration of 10^{-7} M. TeCB/ E_2 failed to induce an additive or synergistic effect. However, TeCB together with toxaphene, appeared to interfere with PRL mRNA expression, although this induction was not statistically significant. Our study demonstrates for the first time that toxaphene exhibits estrogenic activity by modulating PRL mRNA levels in GH₃ cells.

INTRODUCTION

Exposure to environmental contaminants and industrial pollutants possessing endocrine-disrupting properties has resulted in the deregulation of many biological processes, particularly those responsible for reproduction and development, in all classes of vertebrates (Colborn et al., 1993). It is now well recognized that many of these persistent organic pollutants disrupt endocrine homeostasis via interaction with endogenous hormone pathways. Aquatic organisms are particularly at risk to endocrine disruption. Water is the final reservoir for many environmental pollutants, especially in northern regions of the hemisphere. Once in the aquatic environment, these contaminants will bioaccumulate in the food web due to their lipophilic nature, or become stored in sediments only to later re-enter the aquatic ecosystem (Kucklick and Baker, 1998). Cases of endocrine disruption have been reported in numerous aquatic organisms: many species of fish, reptiles, some invertebrate species and mammals. Feminization of fish following exposure to o,p'-DDT (Edmunds et al., 2000), certain alkylphenols (Purdom et al., 1994; Jobling and Sumpter, 1993; Folmar et al., 1996) have been documented. Alligators in Florida, exposed to large amounts of DDT and other organochlorines following a pesticide spill, suffered from deformed reproductive organs (Woodward et al., 1993). Imposex, the development of male genitalia by females, and decreased reproductive success of several marine gastropod species have been linked to exposure to tributyltin (Bryan et al., 1986), a marine anti-fouling agent suspected of interfering with androgen synthesis (Gibbs et al., 1991). Top predators of the Arctic regions, namely polar bears, whales, and seals, display high levels of persistent organic pollutants in their fat stores (Skaare, 2000), and although a causal link between their population declines and exposure to endocrine disruptors is difficult to establish, the presence of these pollutants in the Arctic regions is a growing concern for many conservation biologists.

Toxaphene and PCBs are two of the most prevalent organochlorine environmental contaminants in Canada (Kucklick and Baker, 1998), and they are the two major contaminants found in fish from the Arctic regions of Canada (Lockhart et al., 1992, Braune et al., 1999). Due to their ubiquitous presence in the environment, especially in

Arctic regions where biodegradation of these contaminants is very slow, they are among the 12 persistent organic pollutants targeted in a global treaty by the United Nations.

Prolactin (PRL) is an estrogen-inducible pituitary hormone best known for its ability to induce lactation in mammals. However, it is now known to have more than 300 separate actions and exists in all vertebrates studied thus far (Bole-Feysot et al., 1998). Biological functions of PRL include such processes as water and electrolyte balance, growth and development, metabolism, brain function and behaviour, reproduction, immunoregulation and immunoprotection (Bole-Feysot et al., 1998). In fish and amphibians, the major role of PRL is in maintaining ionic and water balance in fresh-water (Clarke and Bern, 1980). It is referred to as a fresh-water adapting hormone because it promotes the mechanisms required for fish to achieve osmoregulatory homeostasis when in fresh water. PRL reduces salt loss by reducing gill permeability to salt loss by inhibiting gill $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (Madsen and Bern, 1993). This process is of vital importance to freshwater and anadromous fish such as salmon. For example, prolactin producing cells appear very early in the embryonic development of salmonid fish, which lay their eggs in fresh water, suggesting that prolactin may play a role in water and salt balance of fish embryos that develop in freshwater environments (Jobling, 1995). PRL has also been demonstrated to play a role in the storage and metabolism of lipids via interactions with the thyroid hormones (Jobling, 1995).

Only a few *in vitro* studies have shown PRL induction in the presence of estrogenic compounds, particularly bisphenol A (Steinmetz et al., 1997, Chun and Gorski, 2000) and octylphenol (Abraham and Frawley, 1997). No experimental work has been done on PRL mRNA expression by toxaphene and TeCB. Our aim was to analyze the possible modulating role of toxaphene, and PCB congener 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB 77; TeCB), on PRL mRNA expression by semiquantitative RT-PCR in GH₃ rat pituitary-derived cells.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Toxaphene and the PCB congener 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl (TeCB) were purchased from Chem-Service (West Chester, PA). 17 β -estradiol (E₂), diethylstilbestrol (DES), a potent synthetic estrogen, penicillin and streptomycin were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Toxaphene, TeCB and E₂ were freshly prepared in 100% EtOH prior to treatment and serially diluted. Final EtOH concentration in wells was 0.1% (vol/vol) or less.

Cell Culture

GH₃ cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were maintained in Ham's F-10 medium supplemented with 15% horse serum (HS), 2.5 % fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, Grand Island, NY), 25 U/ml penicillin and 25 mg/ml streptomycin. Cells were harvested by incubating in EDTA-PBS solution for 2 min at 37°C. Cells were then seeded in six-well multiwell plates (Becton-Dickinson, Lincoln Park, NJ) at 5×10^4 cells/cm². After 48 h, fresh medium was added containing E₂ (10^{-7} and 10^{-9} M) or DES (10^{-9} M), toxaphene (10^{-6} M to 10^{-12} M), TeCB (10^{-6} to 10^{-11} M), toxaphene/TeCB, toxaphene/E₂, TeCB/E₂ (all equimolar concentrations of 10^{-7} M, with concentration representing maximal PRL induction by toxaphene – see Results) or EtOH (control). Cells were exposed to treatment medium for a period of 4 days. In all experiments, phenol red-free DMEM/F12 (Sigma) was used, supplemented with 15% HS and 2.5% FBS, both treated with dextran-coated charcoal to remove free steroids from the serum (stripped serum).

Cytotoxicity

Cytotoxicity of chemicals employed in this study was evaluated by a colorimetric assay based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity (Roche Diagnostic, Quebec, Canada). Media were collected and centrifuged at 800x g at 4 °C for 2 min. The cell-free supernatant (100 μ l) was used to determine LDH activity by measuring the absorbance at a wavelength of 490 nm according the working procedures from the

supplier's protocol. Total cellular LDH was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100.

Relative quantitative RT-PCR

After 4 days, cells were lysed and total RNA was extracted using 1 ml of lysis mixture (Tri-Reagent®; Sigma) per well, according to manufacturer's protocol. Total RNA was quantified using a diode array spectrophotometer (Hewlett Packard 8452A) and then immediately used for RT-PCR. 1 µg of total RNA was reverse transcribed using 25 U of M-MULV reverse transcriptase (New England Biolabs), 1.5 µM dNTP and 0.0075 µg/µl oligo dT₁₂₋₁₈ (Gibco). Differential PCR amplification of both 18 S ribosomal RNA (QuantumRNA 18 S Internal Standards, Ambion) and PRL single-copy gene was performed in the same vial, using 1 µl of the cDNA reaction mixture, 2.5 U Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics), 1X polymerase buffer containing 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, and 0.2 µM of each forward and reverse primers in a total volume of 50 µl. The PCR conditions were optimized for two sets of primers in the same tube:

18 S 1: 5'-AGGAATTGACGGAAGGGCAC-3'

18 S 2: 3'-GTGCAGCCCCGGACATCTAAG-5'

PRL 1: 5'-AATCCCTGCGCAGGCACCGAAT-3'

PRL 2: 5'-ACCTCTCCCGGAGCTGTTTGAC-3'.

The standardized amplification protocol consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 4 min, followed by 21 sequential cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C for 2 min. Amplification was carried out in a Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 thermocycler. To ensure that quantification was being achieved in an exponential phase, a range of target and standard amounts were amplified over a range of cycles. The final number of 21 cycles was chosen as the time in which the amplified products were still accumulating in a logarithmic fashion, i.e. the system was in the exponential phase. 10 µl of the PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X TAE running buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0). Gels were dipped in Sybr-green solution (Molecular Probe, USA) and visualised by UV-transillumination. Photos

were taken using a Kodak digital camera DC-120 and transferred on a personal computer. Florescent bands were quantified by densitometric measurements using the NIH-image program.

Data analysis

Results of normalized band signals are expressed as relative optical density units and are shown as the mean \pm S.D. An internal control, 18S (Ambion), was used to improve the reliability of the relative quantitative RT-PCR by correcting for sample to sample variations and errors in sample quantitation. A Dunnetts t-test was performed on all data to determine whether results were statistically significant.

RESULTS

The ability of estrogen to induce PRL mRNA levels in GH₃ cells was tested by treating cells with E₂ and DES. A concentration of 10⁻⁹M of E₂ or DES induced a maximal increase of PRL mRNA levels after 4 days of treatment (Fig 1.). This concentration was then used as reference to compare the estrogenic potency of toxaphene and TeCB in GH₃ cells.

Toxaphene at doses of 10⁻⁸ M to 10⁻¹¹M did not significantly induce PRL increase (Fig. 2). The results of toxaphene at 10⁻⁸ M appeared to deviate strongly from the other concentrations, however. At 10⁻⁷ M toxaphene induced a 2-fold increase ($P < 0.005$) in PRL induction.

We also set out to determine the estrogenic potential of TeCB, and found that TeCB did not exhibit any appreciable effect on PRL mRNA levels at the concentrations tested (10⁻⁷ M to 10⁻¹¹ M). Higher concentration of TeCB or toxaphene caused more than 50% toxicity in GH₃ cells as resulted by LDH cytotoxicity test (data not shown). Background PRL signals in all experiments as represented by the control were normalized to 100%. PRL induction was not above background activity in all concentrations tested (Fig. 3). E₂ and DES, however, increased PRL gene expression 5-fold after a 96 h exposure.

We also examined possible synergistic interactions between toxaphene, TeCB and E₂. GH₃ cells were incubated with equimolar concentrations of all compounds (E₂/tox; E₂/TeCB; tox/TeCB) at 10⁻⁷ M. This concentration was chosen on the basis that it would induce maximal PRL levels for toxaphene. No synergistic induction was demonstrated with any of the chemical combinations tested (Fig. 4). Toxaphene, however, did have an additive effect on PRL expression when combined with E₂. TeCB neither induced PRL mRNA expression nor blocked the action of E₂-induced PRL mRNA expression. However, when combined with toxaphene, TeCB did appear to interfere with the induction of PRL mRNA levels.

DISCUSSION

This study presents evidence for an estrogenic effect by toxaphene, but not 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl (TeCB), in rat GH₃ pituitary cells. Toxaphene was able to modulate PRL mRNA levels while TeCB failed to induce any significant changes in PRL mRNA levels.

PRL mRNA levels were induced by toxaphene at doses of 10^{-7} and 10^{-9} M. Estrogenic effects for toxaphene have previously been reported but at higher doses than reported here (Soto et al., 1994; Ramamoorthy et al., 1997). Toxaphene at a dose of 10^{-8} M deviated greatly from the apparent dose-response curve of PRL induction. These results could be due to contamination of the toxaphene preparation by a foreign substance which may have decreased overall cell viability not apparent during the 4 day incubation period.

Interestingly, many conflicting reports exist on whether toxaphene is estrogenic *in vitro* or not. Toxaphene has been demonstrated to be weakly antiestrogenic by preventing estrogenic stimulation of mRNA expression (Ratnasabapathy et al., 1997), inhibiting gene transcription (Bonefeld-Jorgensen et al., 1997) and preventing MCF-7 cell proliferation (Arcaro et al., 2000). Furthermore, Vonier et al. (1996) demonstrated that toxaphene does not interact with the estrogen receptor but appears to play a role in blocking the receptor when combined with other chemicals. On the other hand, several other studies report on the estrogenic properties of toxaphene at concentrations of 10^{-5} M and higher (Soto et al., 1994, 1995; Stelzer and Chan, 1999; Ramamoorthy et al., 1997).

TeCB, on the other hand, did not induce PRL mRNA expression in GH₃ cells nor did TeCB block the effects of E₂ on PRL mRNA when combined with E₂ at an equimolar concentration. Once again, contradictory evidence has been shown that TeCB has both estrogenic and antiestrogenic properties in a variety of assays, both *in vitro* and *in vivo* and can bind to the estrogen receptor (Nesaretnam et al., 1996; Korach et al., 1998). Our findings do not support an estrogenic role for TeCB, but rather evidence that TeCB may have antiestrogenic properties in our assay. A slight, but not statistically significant,

decrease in toxaphene-mediated PRL mRNA expression was noted when TeCB and toxaphene were administered together.

Toxaphene is the most prevalent organochlorine contaminant in arctic fish (Muir et al., 1990, Braune et al., 1999). The estrogenic effect of toxaphene could pose a real threat to osmoregulatory homeostasis as well as to general reproductive fitness in these fish populations. The main site of action for PRL is in gills where it reduces salt loss. Implications of this are that an increase in PRL can perturb ionic regulation in such fish as salmon. Recently, researchers investigating a population of wild salmon in dramatic decline found that 4-nonylphenol, a known endocrine disruptor, was interfering with the smoltification process in juvenile Atlantic salmon. This interference resulted in decreased survival rates during their transition from fresh to salt water (Fairchild et al., 1999). A change in endogenous PRL levels may be increasing demands on fish osmoregulatory mechanisms by disrupting the elimination of excess salt (Madsen and Bern, 1993). Environmental estrogens, present in the aquatic ecosystem, could potentially disrupt the pituitary and as a result modulate levels of endogenous prolactin. This may leave fish that migrate between fresh and salt water vulnerable to changes in osmotic pressure, ultimately affecting their survival.

Our study demonstrates the estrogenic activity of toxaphene at relatively low doses, compared to that of other studies, in which toxaphene was shown to be estrogenic at concentrations of 10^{-5} M (4 ppm) (Soto et al., 1994, Arcaro et al., 2000). Although a link cannot be made between environmental concentrations of toxaphene and results of this study it is interesting to note that in a recent study of organochlorines in Lake Superior's food web the authors found toxaphene levels ranging from 21 - 1360 ppm w/w in biota (Kucklick et Baker, 1998). We show evidence for the potential disruption of neuroendocrine function, as seen by PRL mRNA modulation, in a pituitary cell line. Toxaphene may therefore have the potential to interfere with PRL functions within the organism, ultimately affecting endocrine homeostasis. Furthermore, our system can be used to determine a substance's ability to induce PRL mRNA production based on estrogenic properties. Whether TeCB has an anti-estrogenic, anti-androgenic or

androgenic effect in pituitary-derived cells remains to be determined. The role PCBs and toxaphene play in endocrine disruption appears to be ambiguous but their potential role in osmoregulatory problems in fish does warrant further investigation.

REFERENCES

- Abraham E, Frawley S. Octophenol (OP), an environmental estrogen, stimulates prolactin (PRL) gene expression. *Life Sci* 1997; 60: 1457-1465.
- Arcaro K, Yang Y, Vakharia D, Gierthy J. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. *J Toxicol Environ Health* 2000; 59: 97-210.
- Bole-Feysot C, Vincent G, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Reviews* 1998; 19: 225-268.
- Bonefeld-Jorgensen E, Autrup H, Hansen J. Effect of toxaphene on estrogenic receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1651-1654.
- Braune B, Muir D, DeMarch B, Gamberg M, Poole K, Currie R, Dodd M, Duschenko W, Eamer J, Elkin B, Evans M, Grundy S, Hebert C, Johnstone R, Kidd K, Koenig B, Lockhart L, Marshall H, Reimer K, Sanderson J, Shutt L. Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review. *Sci Total Environ* 1999; 230: 145-207.
- Bryan G, Gibbs P, Hummerstone L, Burt G. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J Mar Biol Assoc UK*. 1986; 66: 611-640.
- Chun T, Gorski J. High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 162: 161-165.
- Clarke W, Bern H. Comparative endocrinology of prolactin. In: Li C, editor. *Hormonal proteins and peptides*, 8. Academic Press, New York, 1980, pp. 105-197.
- Colborn T, vom Saal F, Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 378-384.
- Edmunds J, McCarthy R, Ramsdell J. Permanent and functional male-to-female sex reversal in d-rR strain Medaka (*Oryzias latipes*) following egg microinjection of o,-DDT. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 219-224.
- Fairchild W, Swansburg E, Arsenault J, Brown S. Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption? *Environ Health Perspect* 1999; 107: 349-358.
- Folmar L, Denslow N, Rao V, Chow M, Crain D, Enblom J, Marcino J, Guillette L, Jr. Vitellogenin induction and reduced serum estrosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1096-1101.

- Gibbs P, Pascoe P, Bryan G. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. *Comp Biochem Physio* 1991; 100: 231-235.
- Jobling M. *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series 16. Chapman and Hall, London, UK, 1995, 455 pp.
- Jobling JS, Sumpter J. Detergent components in sewage are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Tox* 1993; 27: 361-372.
- Korach K, Sarver P, Chae K, McLachlan J, McKinney J. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxyphenyls: Conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol* 1998; 33:120-126.
- Kucklick J, Baker J. Organochlorines in Lake Superior's food web. *Environ Sci Technol* 1998; 32: 1192-1198.
- Lockhart W, Wagemann R, Tracey B, Sutherland D, Thomas D. Presence and implications of chemical contaminants in the freshwaters of the Canadian Arctic. *Sci Total Environ* 1992; 122: 165-245.
- Madsen S, Bern H. In-vitro effects of insulin-like growth factor-I on gill Na^+, K^+ -ATPase in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J Endocrinol* 1993; 138: 23-30.
- Muir D, Ford C, Grift N, Metner D, Lockhart W. Geographic variation of chlorinated hydrocarbons in burbot (*Lota lota*) from remote lakes and rivers in Canada. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990; 19: 530-542.
- Nesaretnam K, Corcoran D, Dils R, Darbre P. 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen *in vitro* and *in vivo*. *Mol Endocrin* 1996; 10: 923-936.
- Purdum C, Hardiman P, Bye V, Eno N, Tyler C, Sumpter J. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol* 1994; 8: 275-287.
- Ramamoorthy K, Wang F, Chen I, Norris J, McDonnell D, Leonard L, Gaido K, Bocchinfuso W, Korach K, Safe S. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 1997; 138: 1520-1527.
- Ratnasabapathy R, Tom M, Post C. Modulation of the hepatic expression of the estrogen-regulated mRNA stabilizing factor by estrogenic and antiestrogenic nonsteroidal xenobiotics. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1425-1434.

Skaare J, Bernhoft A, Derocher A, Gabrielsen G, Goksoyr A, Henriksen E, Larsen H, Lie E, Wiig. Organochlorines in top predators at Svalbard-occurrence, levels and effects. *Toxicol Lett* 2000; 15: 112-113.

Soto A, Chung K, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 380-384.

Soto A, Sonnenschein C, Chung K, Fernandez M, Olea N, Serrano F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 1995; 103 (Suppl 7): 113-22.

Steinmetz R, Brown N, Allen D, Bigsby R, Ben-Jonathan N. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 1997; 138: 1780-1786.

Stelzer A, Chan H. The relative estrogenic activity of a technical toxaphene mixture and two individual congeners. *Toxicology* 1999; 138:69-80.

Vonier P, Crain D, McLachlan J, Guillette L Jr., Arnold S. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1318-1322.

Woodward A, Jennings M, Percival H, Moore C. Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. *Florida Sci* 1993; 56: 52-63.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Sylvie Gélinas and Sonya Grenier for their expert technical assistance. This work was supported by an FCAR grant to MGM.

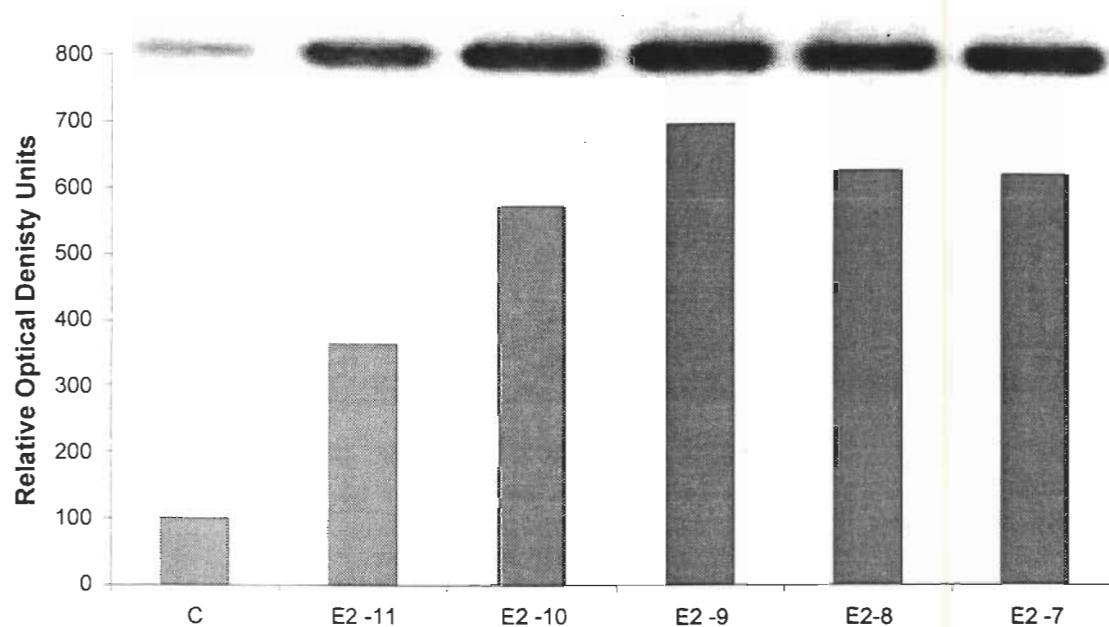
Figure 1.

Figure 1. Comparative RT-PCR. Induction of PRL mRNA levels in GH₃ cells following treatment with different concentration of E₂. PRL mRNA levels expressed as relative optical density units.

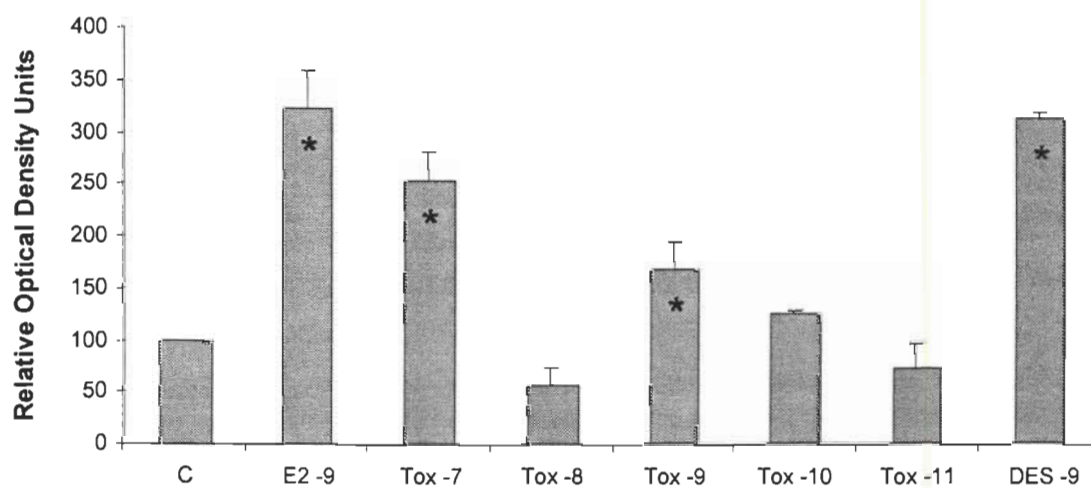
Figure 2.

Figure 2. Induction of PRL mRNA levels in GH₃ cells following treatment with ETOH [control (C)]; E₂ at a concentration of 10⁻⁹ M; toxaphene (Tox) at 10⁻⁷ to 10⁻¹¹ M and diethylstilbestrol (DES) at 10⁻⁹ M. Results are representative of three independent experiments performed in triplicate.

*(P<0.005)

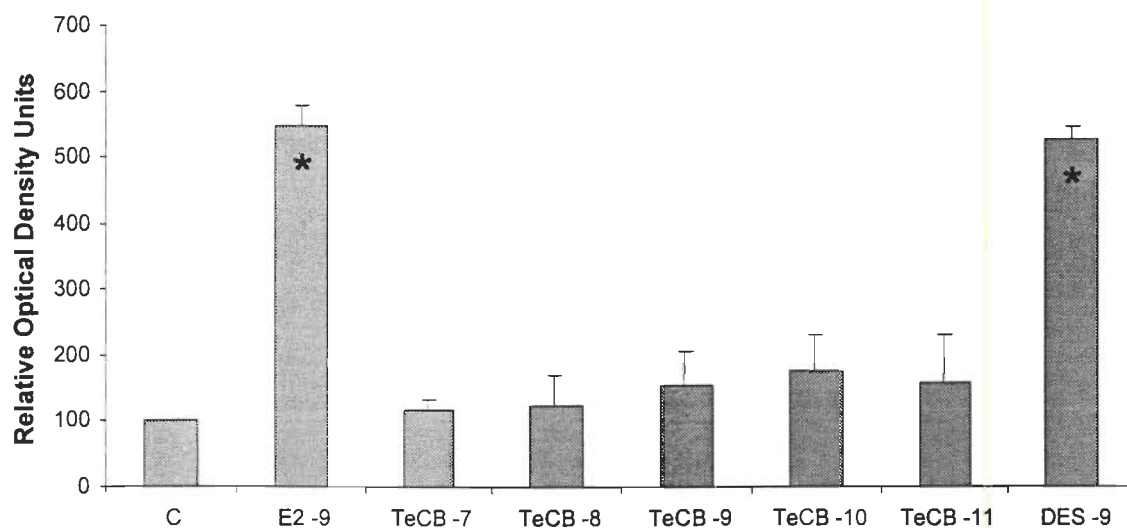
Figure 3.

Figure 3. Induction of PRL mRNA levels in GH₃ cells following treatment with ETOH [control (C)]; E₂ at a concentration of 10⁻⁹ M; TeCB at 10⁻⁷ – 10⁻¹¹ M and diethylstilbestrol (DES) at 10⁻⁹ M. Results are representative of three independent experiments performed in duplicate.

*(P<0.005)

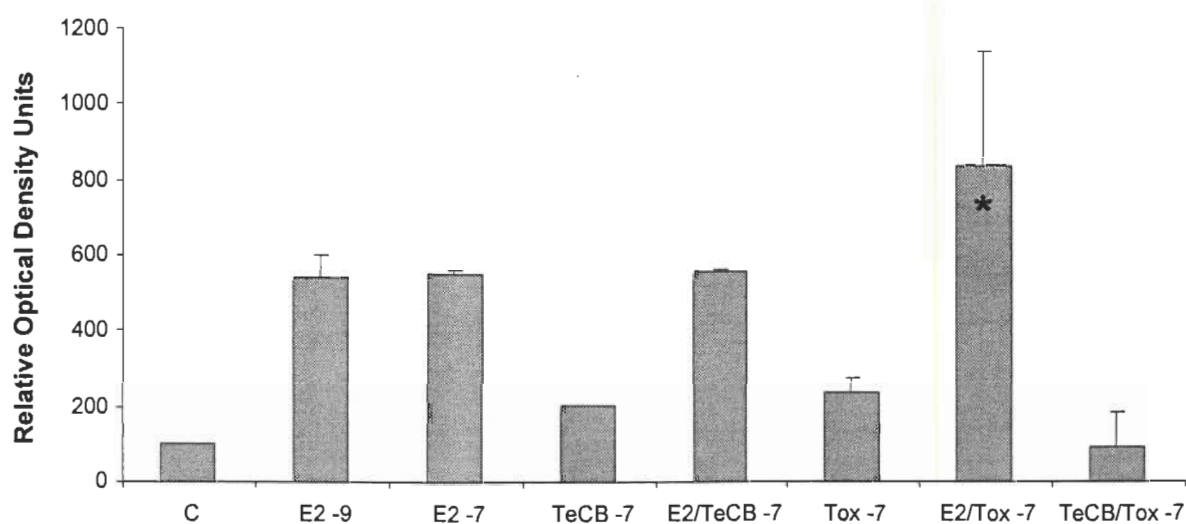
Figure 4.

Figure 4. Induction of PRL mRNA levels in GH₃ cells following treatment with a) ETOH (control); b) E2 at a concentration of 10^{-9} M; c) E2 at 10^{-7} M; d) TeCB at 10^{-7} M; e) E2/TeCB at an equimolar concentration of 10^{-7} M; f) Tox at 10^{-7} M; g) E2/Tox at an equimolar concentration of 10^{-7} M, and h) equimolar combination of TeCB/Tox. Results are representative of three independent experiments performed in triplicate.

*($P < 0.005$)

Chapitre 3. CONCLUSIONS

Les recherches effectuées en laboratoire sont indispensables pour examiner les effets néfastes des contaminants environnementaux. Grâce aux recherches *in vitro*, les mécanismes impliqués dans les perturbations endocriniennes sont mieux compris.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'influence du toxaphène et du TeCB, deux contaminants environnementaux, sur l'expression de l'ARNm de la PRL dans les cellules en culture. L'ensemble des résultats obtenus montre que l'induction de l'ARNm de la PRL n'est pas seulement tributaire de l'E₂, mais peut être induit par le toxaphène, un pesticide qui perturbe le système endocrinien. Les résultats concernant le TeCB indiquent, par contre, que ce dernier n'induit aucun effet sur l'expression de la PRL. Ceci semble être en accord avec la plupart des recherches indiquant plutôt un effet anti-œstrogénique, une propriété qui n'a pas été explorée dans le cadre de cette étude.

Une grande controverse existe autour de la possibilité que les substances perturbatrices du système endocrinien puissent avoir un pouvoir synergique lorsque combinées entre elles (Soto et al., 1995; Sumpter et Jobling, 1995; Bergeron et al., 1994). Durant la présente recherche, nous avons tenté de vérifier cette hypothèse. Les résultats obtenus ont permis de constater que l'E₂ mélangé avec le toxaphène n'avait pas d'effet synergique, mais plutôt un effet additif. Toutefois, le TeCB semble avoir diminué l'ampleur de l'effet œstrogénique du toxaphène lorsque simultanément administrés. Ce résultat suggère que le TeCB possède un effet anti-œstrogénique. Il semble possible que le TeCB puisse bloquer les sites de liaisons situés sur les récepteurs de l'œstrogène en inhibant la liaison du toxaphène et en diminuant l'activation du gène de la PRL. Toutefois, d'autres études au niveau moléculaire seront nécessaires pour valider cette hypothèse.

Cette recherche a également permis de constater que la culture cellulaire est un excellent moyen d'investigation pour étudier les effets œstrogéniques des contaminants environnementaux. L'utilisation de la culture des cellules hypophysaires de rat (GH₃) nous a permis de mettre en évidence l'influence des polluants dans le contrôle hormonal

de la synthèse de la PRL, une hormone importante pour plusieurs fonctions biologiques chez tous les vertébrés.

Les résultats obtenus dans la présente recherche constituent bien modestement l'équivalent d'une goutte d'eau dans l'océan dans les champs d'études des propriétés œstrogéniques des contaminants environnementaux. Toutefois chaque goutte d'eau est importante et ouvre la voie à d'autres recherches. Ainsi, les résultats de la présente recherche soulèvent donc d'autres problématiques :

1. Étudier l'induction de l'ARNm de la PRL par E_2 en présence de ICI-342870, un bloqueur du récepteur de l'œstrogène. Le ICI-342870 se couple au récepteur de l'œstrogène avec une affinité plus forte que l' E_2 . Par la suite l' E_2 ne peut plus se coupler à son récepteur ce qui résulte en une inhibition totale de l'effet physiologique. Il est bien établi que l' E_2 induit la PRL via le récepteur de l'œstrogène alors, ce test permettra de vérifier si le toxaphène, en présence du ICI-342870, induit la PRL via le récepteur de l'œstrogène également. Si son effet œstrogénique résulte de son couplage au récepteur de l'œstrogène, l'induction de la PRL serait inhibée complètement en présence du toxaphène. Il serait possible que l'effet œstrogénique du toxaphène soit lié à d'autres mécanismes cellulaires moins étudiés.
2. Tester si le métabolite du TeCB, le TeCB hydroxylé (OH-TeCB) est œstrogénique comme plusieurs chercheurs l'affirment.
3. Investiguer si le TeCB a des propriétés anti-œstrogéniques/anti-androgéniques. Pour étudier les effets anti-œstrogéniques, le ICI-342870 peut être utilisé.

En terminant, le TeCB et le toxaphène ne sont que deux des milliers de contaminants présents dans notre environnement et la présente recherche ne s'est attardée qu'à mesurer leurs effets œstrogéniques. Les recherches sur les effets des substances perturbatrices sont si vastes et si récentes qu'il faudra encore plusieurs années avant de prétendre avoir une

bonne connaissance du sujet. La citation du D^r Micheal Wade (Santé Canada), illustre bien cet état : « Étant donné le manque de connaissances scientifiques sur le rôle des perturbations endocriniennes [...] cette question continuera sans doute de susciter des débats animés et demeurera probablement un domaine de recherche prioritaire pendant encore un bon nombre d'années ».

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, E., and Frawley, S. 1997. Octophenol (OP), an environmental estrogen, stimulates prolactin (PRL) gene expression. *Life Sci.* 60:1457-1465.
- Arcaro, K., Yang, Y., Vakharia, D. and Gierthy, J. 2000. Toxaphene is antiestrogenic in a human breast-cancer cell assay. *J. Toxicol. Environ. Health.* 59:197-210.
- Barrie, L., Gregor, D., Hargrave, B., Lake, R., Muir, D., Shearer, R., Tracey, B. and Bidleman, T. 1992. Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 122:1-74.
- Béland, P., DeGuise, S., Girard, C., Lagacé, A., Martineau, D., Michaud, R., Muir, D., Norstrom, R., Pelletier, E., Ray, S. and Shugart, L. 1993. Toxic compounds and health and reproductive effects in St. Lawrence beluga whales. *J. of Great Lakes Res.* 19:766-775
- Bergeron, J., Crews, D. and McLachlan, J. 1994. PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102:780-781.
- Bole-Feysot, C., Vincent, G., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19:225-268.
- Bonefeld-Jorgensen, E., Autrup, H. and Hansen, J. 1997. Effect of toxaphene on estrogenic receptor functions in human breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 18:1651-1654.
- Braune, B., Muir, D., DeMarch, B., Gamberg, M., Poole, K., Currie, R., Dodd, M., Duschenko, W., Eamer, J., Elkin, B., Evans, M., Grundy, S., Hebert, C., Johnstone, R., Kidd, K., Koenig, B., Lockhart, L., Marshall, H., Reimer, K., Sanderson, J. and Shutt, L. 1999. Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review. *Sci. Total Environ.* 230:145-207.
- Bryan, G., Gibbs, P., Hummerstone, L. and Burt, G. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 66:611-640.
- Burlington, H. and Lindeman, V. 1950. Effect of DDT on testes and secondary sex characters of white leghorn cockerels. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 74:48-51.

- Chun, T. and Gorski, J. 2000. High concentrations of bisphenol A induce cell growth and prolactin secretion in an estrogen-responsive pituitary tumor cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 162:161-165.
- Colborn, T. and Clements, C., (Eds.). 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton, New Jersey, Princeton Scientific Publishing, 403 pp.
- Colborn, T., vom Saal, F. and Soto, A. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101:378-384.
- Courtney, D., Sandau, C., Ayotte, P., Dewailly, E., Duffe, J. and Norstrom, R. 2000. Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit. *Environ. Health Perspect.* 108:611-616.
- de Geus, H., Besselink, H., Brouwer, A., Klungsoyr, J., McHugh, B., Nixon, E., Rimkus, G., Wester, P. and de Boer, J. 1999. Environmental occurrence, analysis, and toxicology of toxaphene compounds. *Environ. Health Perspect.* 107:115-44.
- Dobson, S. and van Esch, G. 1993. *Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls*, ed. 2, Environmental Health Criteria 140. World Health Organisation, Geneva Switzerland.
- Edmunds, J., McCarthy, R., and Ramsdell, J. 2000. Permanent and functional male-to-female sex reversal in d-rR strain medaka (*Oryzias latipes*) following egg microinjection of o,-DDT. *Environ. Health Perspect.* 108:219-224.
- Environnement Canada. 1986. *Enviroguide : manuel d'introduction / Conservation et protection*, Direction générale des programmes de protection de l'environnement, Direction du développement de la technologie et des services techniques, Ottawa.
- Fairchild, W., Swansburg, E., Arsenault, J. and Brown, S. 1999. Does an association between pesticide use and subsequent declines in catch of Atlantic salmon (*Salmo salar*) represent a case of endocrine disruption? *Environ. Health Perspect.* 107:349-358.
- Fielden, M., Chen, I., Chittim, B., Safe, S. and Zacharewski, T. 1997. Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155). *Environ. Health Perspect.* 105:1238-48.
- Folmar, L. C., Denslow, N., Rao, V., Chow, M., Crain, D., Enblom, J., Marcino, J. and Guillette, L. Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum estrosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104:1096-1101.

- Gibbs, P., Pascoe, P. and Bryan, G. 1991. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol.* 100:231-235.
- Gray, L. Jr., Ostby, J., Kelce, W. 1994. Developmental effects of an environmental antiandrogen: the fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 129:46-52.
- Guillette L. Jr., Gross T., Masson, G., Matter, J., Percival H. and Woodward, A. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* 102:680-688.
- Guillette, L. Jr., Crain, D., Rooney, A. and Pickford, D. 1995. Organization versus activation: The role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 7 103:157-164.
- Guo, Y., Hsu, P., Hsu, C. and Lambert, G. 2000. Semen quality after prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Lancet* 356:1240-1241.
- Harries, J., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E., Rycroft, R., Sumpter, J. and Tylor, T. 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environm. Toxicol. Chem.* 15:1993-2002.
- Harries, J., Sheahan, D., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J., Tylor, T. and Zaman, N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:534-42.
- Hodges, L., Bergerson, J., Hunter, D., Walker, C. 2000. Estrogenic effects of organochlorine pesticides on uterine leiomyoma cells *in vitro*. *Toxicol. Sci.* 54:355-364.
- Høyer, A., Grandjean, P., Jorgensen, T., Brock, J. and Hartvig, H. 1998. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352:1816-1820.
- Jansen, H., Cooke, P., Porcelli, J., Liu, T. and Hansen, L. 1993. Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: *in vitro* and *in vivo* studies. *Reprod. Toxicol.* 7:237-48.
- Jennings, M., Percival, H. and Woodward, A. 1988. Evaluation of alligator hatchling and egg removal from three Florida lakes. *Proc. Ann. Conf. Southeast Assoc. Fish Wildlife Agencies.* 42:283-294.
- Jobling, M., (Ed). 1995. *Environmental Biology of Fishes*. Fish and Fisheries Series 16. Chapman and Hall, London, UK. 455 pp.

- Jobling, J. S. and Sumpter, J. 1993. Detergent components in sewage are weakly oestrogenic to fish: An *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicol.* 27:361-72.
- Kendall, R., Dickerson, R., Suk, W. and Geisy, J. (Eds.). 1998. *Principles and Processes for Assessing Endocrine Disruption in Wildlife*. SETAC Press, Pensacola, FL, USA. 672 pp.
- Korach, K., Sarver, P., Chae, K., McLachlan, J. and McKinney, J. 1988. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol. Pharmacol.* 33:120-6.
- Korach, K., Davis, V., Curtis, S. and Bocchinfuso, W. 1997. Xenoestrogens and estrogen receptor action. In Thomas, J. and Colby, H (Eds.), *Endocrine Toxicology*, 2nd ed. Taylor and Francis, Washington, D.C., pp. 181-212.
- Krishnan, V. and Safe, S. 1993. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120:55-61.
- Kucklick, J. and Baker, J. 1998. Organochlorines in Lake Superior's food web. *Environ. Sci. Technol.* 32:1192-1198.
- Lee, G., Hughes, R. and Veith, G. 1977. Evidence for partial degradation of toxaphene in the aquatic environment. *Water Air Soil Pollut.* 8:479-484.
- Lockhart, W., Wagemann, R., Tracey, B., Sutherland, D. and Thomas, D. 1992. Presence and implications of chemical contaminants in the freshwaters of the Canadian Arctic. *Sci. Total Environ.* 122:165-245.
- Macdonald, R., Barrie, L., Bidleman, T., Diamond, M., Gregor, D., Semkin, R., Strachan, W., Li, Y., Wania, F., Alaee, M., Alexeeva, L., Backus, S., Bailey, R., Bewers, J., Gobeil, C., Halsall, C., Harner, T., Hoff, J., Jantunen, L., Lockhart, W., Mackay, D., Muir, D., Pudykiewicz, J., Reimer, K., Smith, J. and Stern, G. 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 254:93-234.
- Muir, D., Braune, B., DeMarch, B., Norstrom, R., Wagemann, R., Lockhart, L., Hargrave, B., Bright, D., Addison, R., Payne, J. and Reimer, K. 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian Arctic marine ecosystem: a review. *Sci. Total Environ.* 230:83-144.
- Nagler, J., Bouma, J., Thorgaard, G. and Dauble, D. 2001. High incidence of a male-specific genetic marker in phenotypic female Chinook salmon from the Columbia River. *Environ. Health Perspect.* 109:67-69.

- Nesaretnam, K., Corcoran, D., Dils, R. and Darbre, P. 1996. 3,4,3,4-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Endocrin.* 10:923-936.
- NRC (National Research Council). 1999. Hormonally Active Agents in the Environment. Washington, DC, National Academy Press.
- ONU. 1997. [Online], Available: <http://www.unep.org>.
- Purdom C. E., Hardiman, P., Bye, V., Eno, N. Tyler, C. and Sumpter, J. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275-287.
- Rajapakse, N., Ong, D., and Kortenkamp, A. 2001. Defining the impact of weakly estrogenic chemicals on the action of steroidal estrogens. *Tox. Sci.* 60:296-304.
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I., Norris, J., McDonnell, D., Leonard, L., Gaido, K., Bocchinfuso, W., Korach, K., and Safe, S. 1997. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology* 138:1520-7.
- Ramamoorthy, K., Gupta, M., Sun, G., McDougal, A. and Safe, S. 1999. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl exhibits antiestrogenic and antitumorigenic activity in the rodent uterus and mammary cells and in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20:115-23.
- Ratnasabapathy, R., Tom, M. and Post, C. 1997. Modulation of the hepatic expression of the estrogen-regulated mRNA stabilizing factor by estrogenic and antiestrogenic nonsteroidal xenobiotics. *Biochem. Pharmacol.* 53:1425-1434.
- Rhode, P. and Gorski, J. 1991. Growth and cell cycle regulation of mRNA levels in GH3 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 82:11-22.
- Ross, P. S., Ellis, G., Ikonomou, M., Barrett-Lennard L., and Addison, R. 2000. High PCB concentrations in free-ranging Pacific Killer Whales, *Orcinus orca*: Effects of age, sex and dietary preference. *Marine Pollution Bulletin* 40:504-515.
- Safe, S. 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 24:87-149.
- Skaare, J. U, Bernhoft, A., Derocher, A., Gabrielsen, G., Goksoyr, A., Henriksen, E., Larsen, H., Lie, E., Wiig. 2000. Organochlorines in top predators at Svalbard-occurrence, levels and effects. *Toxicol. Lett.* 15:112-113.
- Smeets, J., van Holsteijn, I., Giesy, J., Seinen, W., van den Berg, M. 1999. Estrogenic potencies of several environmental pollutants as determined by vitellogenin induction in a carp hepatocyte assay. *Toxicol. Sci.* 50:206-213.

- Sonnenschein, C., Soto, A., Fernandez, M., Olea, N., Olea-Serrano, M. and Ruiz-Lopez, M. 1995. Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin. Chem.* 41:1888-95.
- Soto, A., Lin, T., Justicia, H., Wray, J. and Sonnenschein, C. 1991. p-Nonylphenol: An estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* 92:167-173.
- Soto, A., Chung, K. and Sonnenschein, C. 1994. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* 102:380-384.
- Soto, A., Sonnenschein, C., Chung, K., Fernandez, M., Olea, N. and Serrano, F. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 7 103:113-22.
- Stelzer, A. and Chan, H.. 1999. The relative estrogenic activity of technical toxaphene mixture and two individual congeners. *Toxicology* 138:69-80.
- Steinmetz, R., Brown, N., Allen, D., Bigsby, R. and Ben-Jonathan, N. 1997. The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology* 138:1780-1786.
- Sumpter, J., and Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Env. Health Perspect. Suppl.* 7 103:173-178.
- Swackhamer, D., Pearson, R. and Schottler, S. 1998. Toxaphene in the Great Lakes. *Chemosphere* 37:2545-61.
- U.S. EPA. 1997. [Online], Available: <http://www.epa.gov/endocrine/>
- Vonier, P. M., Crain, D. McLachlan, J., Guillette, L. Jr. and Arnold, S. 1996. Interaction of environmental chemicals with the estrogen and progesterone receptors from the oviduct of the American alligator. *Environ. Health Perspect.* 104:1318-1322.
- Whittle, D., Kiriluk, R., Carswell, A., Keir, M. and MacEachen, D. 2000. Toxaphene congeners in the Canadian Great Lakes basin: temporal and spatial food web dynamics. *Chemosphere* 40:1221-6.
- Willingham, E., Baldwin, R., Skipper, J. and Crews, D. 2000. Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal-kidney-gonad of the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2:202-7.
- Woodward, A., Jennings, M., Percival, H. and Moore, C. 1993. Low clutch viability of American alligators on Lake Apopka. *Florida Sci.* 56:52-63

ANNEXE 1

Liste des substances perturbatrices du système endocrinien.

Herbicides		
- 2,4-D - 2,4,5-T - acetochlor - alachlor - amitrole - atrazine - bromacil - bromoxynil - cyanazine - DCPA	- ethiozin - glufosinate-ammonium - ioxynil - linuron - metribuzin - molinate - nitrofen - oryzalin - oxyacetamide (FOE 5043) - paraquat	- picloram - pendimethalin - prodiamine - pronamide - simazine - terbutryn - thiazopyr - trichlorobenzene - trifluralin
Fungicides		
- benomyl - etridiazole - fenarimol - fenbuconazole - hexachlorobenzene	- mancozeb - maneb - metiram - nabam - pentachloronitrobenzene	- triadimefon - tributyltin - vinclozolin - zineb - ziram
Insecticides		
- aldrin - bifenthrin - carbaryl - carbofuran - chlordane - chlordecone - chlorfentezine - l-cyhalothrin - DDT and metabolites (DDE, DDD) - deltamethrin - dicofol - dieldrin	- dimethoate - dinitrophenol - endosulfan (a and B) - ethofenprox - fenitrothion - fenvalerate - fipronil - β -HCH - heptachlor and H-epoxide - endrin - lindane (g-HCH) - malathion - methomyl	- methoxychlor - mirex - oxychlordane - parathion (methylparathion) - photomirex - pyrethrins - synthetic pyrethroids - ronnel (fenchlorfos) - toxaphene - transnonachlor - aldicarb - DBCP - n-2-fluorenylacetamide
Autres types de pesticides		
- ethylene thiourea (ETU) - pentachlorobenzene	- pentachlorophenol (PCP) - piperonyl butoxide	
Produits industriels		
- 4-OH-alkylphenol - aluminum* - benzopyrene - bisphenol-A - 4-OH-biphenyl - t-butylhydroxyanisole (BHA) - cadmium* - carbon disulfide - dioxin (2,3,7,8-TCDD) - furans	- 4-OH 2',3',4',5' tetrachlorobiphenyl - 2,2',3,3',6,6' hexachlorobiphenyl - pentabromodiphenyl ether - penta- to nonylphenols - phthalates - benzylbutylphthalate - diethylhexylphthalate (DEHP) - diisobutylphthalate - dinhexylphthalate (DnHP) - di-n-octylphthalate (DnOP)	

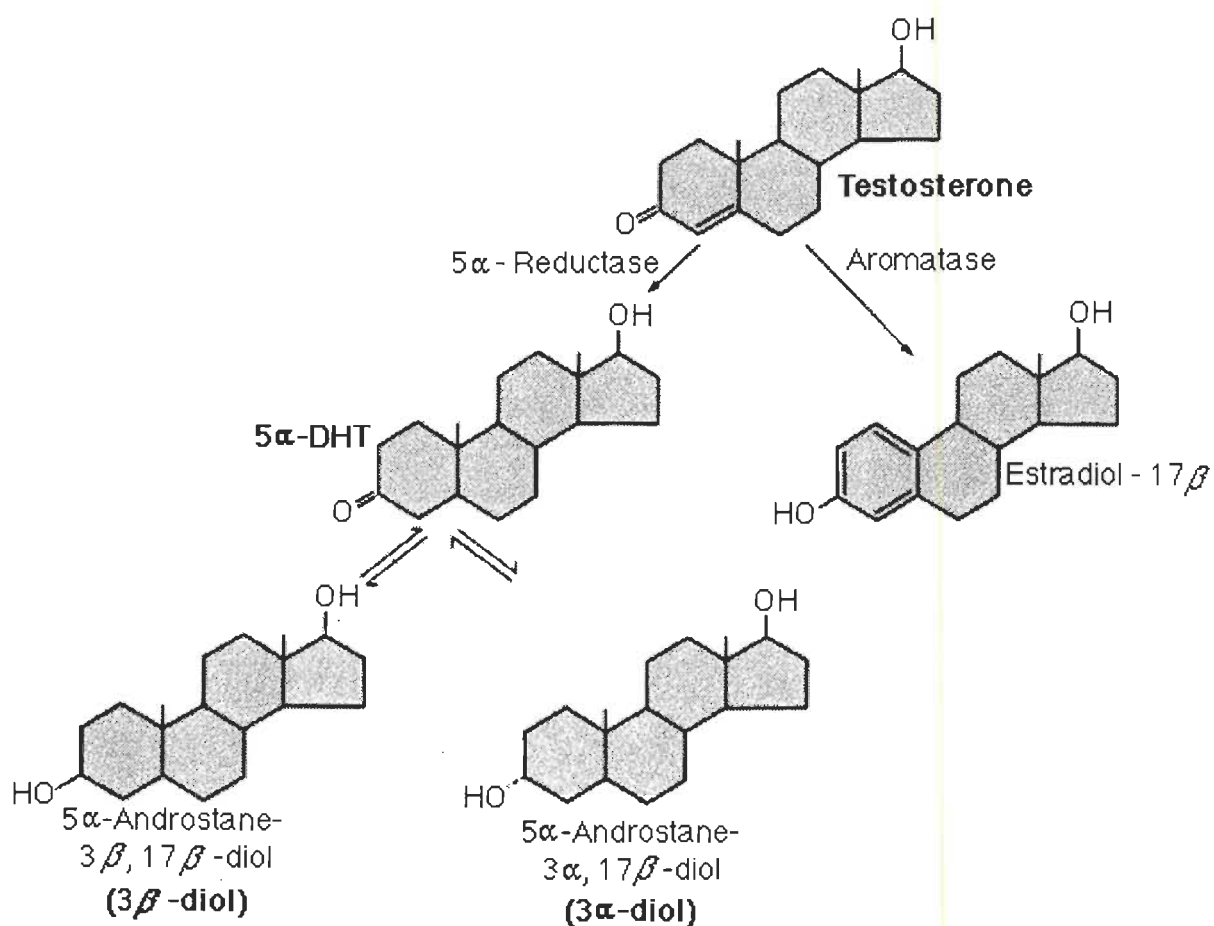
- hydroxy (hydro)-quinones	- diOHbenzoicacids (DHBA)
- lead*	- phenol
- mercury*	- polychlorinated diphenyl ether
- methylcolanthrene (MCA)	- radioactive iodine
- polybrominated biphenyls (PBBs)	- resorcinol
- polychlorinated biphenyls (PCBs)	- styrenes
- 2 to 4-OH 2',5' dichlorobiphenyl	- tetrachloro-benzyltoluenes
- 2,3,4 trichlorobiphenyl	- thiocyanate
- 4-OH trichlorobiphenyls (2,2',5;2',4',6')	- vinyl acetate
- 3-OH 2',3',4',5' tetrachlorobiphenyl	*metals

Source : Le Fonds mondial pour la nature (WWF).

ANNEXE 2

Synthèse des hormones androgènes et de l'estradiol.

Chez les escargots de mer, le tributyl-étain (TBT) agit sur le système endocrinien en inhibant l'enzyme aromatase. Il semble alors que le TBT bloque la conversion de testostérone au estradiol. En conséquence, son activité androgénique induit la croissance d'un pénis chez la femelle escargot de mer à des concentrations aussi faible que 2.5 ng/L (Gibbs et al., 1991).



ANNEXE 3

The Science of the Total Environment: Guide for Authors

The Science of the Total Environment

An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Man

For more information/suggestions/comments please contact p.henn@elsevier.co.uk

With immediate effect the journal will charge for colour for both regular and Special/Thematic issues. Please contact Simon Richert (s.richert@elsevier.co.uk) at Elsevier Science for up to date pricing information.

Guide for Authors

Types of contributions

Full papers reporting original work.

Short Communications. A means for communicating urgent matter or the reporting of preliminary findings with a minimum of publication delay.

Technical Notes. Very brief descriptions of new, or modifications of existing techniques which mark major advances and are of practical value.

Letters to the Editor. A means of allowing written discussion of papers published in the journal. Letters are accepted on the basis of originality and timeliness.

Reviews. Critical evaluation of existing data for defined fields of investigation together with considerations of historical development of topics. Those wishing to prepare a review should first consult the Managing Editor or Associate Editors concerning acceptability of topic and length.

Proceedings of symposia and/or conferences will be considered for publication. One of the Editors should be contacted as early as possible to discuss details.

Submission of papers

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. The original and two copies of the manuscript may be submitted to one of the following addresses: Dr. E.I. Hamilton, 6 Brockhurst Park, Mardon, Paignton, Devon, TQ3 1LB United Kingdom, or Dr. J.O. Nriagu, Department of Environmental and Industrial Health, School of Public Health, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109-2029, USA. They may also be sent to the nearest member of the Editorial Board. All questions arising *after acceptance* of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to: the Science of the Total Environment, Editorial Department, Elsevier Science Ireland Ltd., Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: (+353-61) 709600. Fax: (+353-61) 709114.

Manuscripts

Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Manuscripts should be typewritten, typed on one side of the paper, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Underline words that should be in italics, and do not underline any other words.

Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organised in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail number of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address to which the proofs should be sent

Abstract: The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words

Key words (indexing terms) normally 316 items

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information, research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled. The typesetter will then know that the enclosed matter is not to be set in type. When a typewritten character may have more than one meaning (e.g. the lower case letter l may be confused with the numeral 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear to the typesetter. If Greek letters or uncommon symbols are used in the manuscripts, they should be written very clearly, and if necessary a note such as "Greek lower-case chi" should be put in the margin encircled. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Electronic manuscripts: Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. For the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. For the processing of *accepted papers*, electronic versions are preferred. After *final acceptance*, your disk plus three final and exactly matching printed versions should be submitted together. Double density (DD) or high density (HD) diskettes (3 1/2 or 5 1/4 inch) are acceptable. It is important that the file saved is in the native format of the wordprocessor program used. Label the disk with the name of the computer and wordprocessing package used, your name, and the name of the file on the disk. Further information may be obtained from the Publisher.

Tables

Should be typed in double spacing on separate pages and numbered in Arabic numerals according to their sequence in the text. Each table should have a brief descriptive heading which makes its general meaning understandable without reference to the text.

Illustrations

The figures should be submitted in a form suitable for reproduction drawn in Indian ink on drawing or tracing paper with lettering. They should preferably be of such a size that at the same degree of reduction can be applied to all of them, and particular care should be taken to make any lettering sufficiently thick and large. Photographs should have good contrast and intensity. Sharp, glossy photographs are required to obtain good halftones. Photographs should be supplied in their final size. Draw bar scales on all micrographs instead of providing a numerical scale in the figure caption. Each illustration should be numbered according to the sequence of its appearance in the text, where they should be referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc. Each illustration should have a legend, all the legends being gathered together on a separate sheet.

Units, abbreviations, footnotes

Authors are recommended to use SI units. If non-SI units are used, a conversion factor to SI units should be provided. Authors should follow the recommendations of the IUPAC Manual of Symbols and Terminology for Physico-Chemical Quantities and Units, *Pure and Applied Chemistry*, 21 (1970) 1, and its appendices. The IUPAC conventions should be used whether or not the paper is in English.

Widely accepted forms of abbreviations should be used. The full expression followed by the abbreviation should be given the first time it appears in the text. Footnotes should only be used if absolutely essential. They must be indicated by asterisks. They should not be numbered and included with the references.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1993) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1994, pp. 12-16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al." This indication, however, should never be used in the list of references. In this list, names of first author and co-authors should be mentioned.
4. Reference citations in the text should be arranged chronologically. This list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Dufrenne J, Soentoro P, Tatini S, Day T, Notermans S. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food protection. *Int J Food Microbiol* 1994; 23: 99-100.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical*
Notermans S, Donnelly PK. Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products. In: Jakobsen M, editor. IUMS-ICFMH Fifteenth Int. Symp. Novel Approaches towards Food Safety Assurance, 31 August-3 September 1993, Bingen/Rhine, Germany, 1994; 24: 41-52.
 - c. *For books*
Jesenská Z. Micromycetes in Foodstuffs and Feedstuffs. *Progress in Industrial Microbiology*, 28. Elsevier, Amsterdam, 1993, 256 pp.
 - d. *For multi-author books*
Caddick MX. Nitrogen metabolite repression. In: Martinelli SD, Kinghorn JP, editors. *Aspergillus: 50 Years on Progress in Industrial Microbiology*, 29. Elsevier, Amsterdam, 1994, pp. 323-353.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International List of Periodical Title Word Abbreviations.
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Reference citation by the number system is not acceptable.

Copyright

An author, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that he is not infringing a copyright. Although in general an author may quote from other published works, they should obtain permission from the holder of the copyright if they wish to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Reprint

Twenty-five reprints of Regular Papers, Short Communications and Notes will be supplied free of charge. For review articles one hundred offprints will be supplied free of charge. Additional reprints can be ordered by the authors. An order form containing price quotations will be sent to the author together with the proofs.

of the article.

The Science of the Total Environment carries no page charges, apart from the inclusion of colour figures. Please contact Simon Richert (s.richert@elsevier.co.uk) at Elsevier Science for further information.

ANNEXE 4

Lettre d'autorisation du Doyen des études de cycles supérieurs, M. Alain Maire.



Université du Québec à Trois-Rivières

C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada / G9A 5H7
Téléphone: (819) 378-5011

Le 23 mars 2000

Madame Meghan Graham
1107, Ste-Julie
Trois-Rivières
G9A 1Y4

OBJET: Rédaction de votre mémoire en langue anglaise

Madame,

Au terme de l'étude que nous avons faite de votre demande, je vous confirme par la présente que vous êtes autorisée à rédiger en langue anglaise votre mémoire de maîtrise en Sciences de l'environnement (programme 3403).

Je précise néanmoins que vous devrez présenter un résumé substantiel (une dizaine de pages) de votre mémoire qui sera rédigé en français et dans lequel seront exposés les objectifs, la méthodologie de même que les résultats obtenus de votre travail et ce, en conformité avec l'article D45 du Règlement des études de cycles supérieurs entré en vigueur le 1^{er} janvier 2000.

Vous souhaitant plein succès dans votre travail de recherche, je vous prie d'agréer, madame Graham, l'expression de mes salutations les meilleures.

Le Doyen des études de cycles supérieurs
et de la recherche

Alain Maire

/dp

c.c.: Mme Maria-Grazia Martinoli, directrice du comité d'études de cycles supérieurs (Sciences de l'environnement) et directrice de recherche